Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Dir.: Prof.Dr. G. Röhrborn)

UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTAGENITÄT DES ACRIDINDERIVATES TRYPAFLAVIN INDUZIERTE CHROMOSOMENABERRATIONEN IN METAPHASE II OOCYTEN DER MAUS NACH CHRONISCHER APPLIKATION

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

FRANZ NOBIS

1979

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544318_0031

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Dir.: Prof. Dr. G. Röhrborn)

UNTERSUCHUNGEN ZUR MUTAGENITÄT DES ACRIDINDERIVATES TRYPAFLAVIN INDUZIERTE CHROMOSOMENABERRATIONEN IN METAPHASE II OOCYTEN DER MAUS NACH CHRONISCHER APPLIKATION

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

FRANZ NOBIS

1978

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

Druck und Einband: Rudolf Stehle GmbH & Co KG - Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Literaturbefunde über Reaktionsmechanismen und mutagene Wirkung der Acridine	21
III.	Eigene Untersuchungen	
	1. Problemstellung	49
	2. Material und Methode	53
	2.1. Ablauf der Oogenese	53
	2.2. Testsubstanz	56
	2.3. Versuchstiere	59
	2.4. Applikation der Testsubstanz	60
	2.5. Präparation	62
	2.6. Auswertung	65
	3. Experimente und Ergebnisse	68
	3.1. Anteil auswertbarer Oocyten	68
	3.2. Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchung	69
	4. Diskussion	83
	4.1. Wirkung von Trypaflavin auf die Spermatogenese	85
	4.2. Wirkung von Trypaflavin auf die Oogenese	89
	5. Zusammenfassung	104
	6. Literaturverzeichnis	107

I. Einleitung

Auswirkung von Chromosomenaberrationen beim Menschen.

Aus den Untersuchungen menschlicher Fehlgeburten und Spontanaborten, sowie mißgestalteter Neugeborener ergibt sich, daß Chromosomenanomalien in hohem Maße als Ursache derartiger Ereignisse anzusehen sind. Dies wird allein schon durch die große Differenz der Anzahl der gefundenen Chromosomenaberrationen in induzierten Aborten (2,5 %) und Spontanaborten (25 %, nach einem Bericht der Weltgesundheitsorganisation von 1970) belegt. Die Angaben über die Rate an Chromosomenaberrationen unter den Aborten schwanken beträchtlich von Autor zu Autor.

So beträgt der Anteil anormaler Karyotypen in Spontanaborten nach Larson und Titus (1970) 19 %, nach Untersuchungen von Ruzicska und Czeizel (1970), die Aborte des ersten Trimesters analysierten, 25 %. In Untersuchungen von Boué et al. (1975) wiesen sogar 61 % der Spontanaborte bis zur 14. Schwangerschaftswoche Chromosomenaberrationen auf. Die Ergebnisse von Knörr und Knörr-Gartner (1977) basieren auf der Chromosomenanalyse kultivierter Gewebeproben von Spontanaborten, die das Entwicklungsstadium der 16. Schwangerschaftswoche nicht überschritten hatten. Von diesen erwiesen sich rund 47 % als chromosomal abnormal.

Als Ursachen der Streuung der angegebenen Werte sind sowohl regionale Unterschiede, verschiedene Erfassungsweisen und unterschiedliche Anteile unerkannter induzierter Aborte unter den 'Spontanaborten', als auch das unterschiedliche

Alter der beobachteten Aborte anzuführen. Es lassen sich jedoch trotz der unterschiedlichen Werte gewisse grundsätzliche Gemeinsamkeiten der Untersuchungsergebnisse aufweisen:

1. Unter den Spontanaborten des ersten Trimesters fanden sich etwa sechsmal mehr gonosomale Monosomien als autosomale Monosomien. Dies läßt nach Röhrborn (1971) den Schluß zu, daß entweder autosomale Monosomien weniger häufig auftreten oder in der frühen Embryogenese häufiger eleminiert werden. Bei den gonosomalen Anomalien herrscht die Monosomie X nach Knörr (1977) mit über 90 % eindeutig vor.
2. Trisomien bestimmter Chromosomen sind um so häufiger, je kleiner sie sind. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden die Chromosomen der F-Gruppe. Nach Röhrborn (1974) könnte dies auf eine bessere Paarung großer Chromosomen in der Prophase I und dadurch bedingter regelmäßigerer Verteilung auf die Tochterkerne oder auf ein so frühes Absterben der Embryonen mit Trisomien der großen Chromosomen zurückzuführen sein, daß sie in der Untersuchung der Spontanaborte kaum bzw. nicht zur Beobachtung gelangen. Trisomien sind die häufigsten Befunde unter den Chromosomenaberrationen in Spontanaborten. Carr (1971) gibt ihre Häufigkeit mit 45 %, Boué et al. (1975) mit 52 % an.
3. Triploidien: Sie sind die häufigsten spezifischen Chromosomenaberrationen der Spontanaborte. In den Untersuchungen von Boué beträgt ihre Inzidenz etwa 19,8 %. Sie beruhen auf einer fehlerhaften maternen oder paternen Gametogenese. Störungen im Ablauf der ersten oder zweiten Reifeteilung der Eizelle, die damit verbunden sind, daß Polkörperchen nicht

ausgestoßen werden, führen zu einem diploiden Chromosomensatz der Eizelle. Bei der Befruchtung einer solchen diploiden Eizelle durch ein normales haploides Spermium entsteht eine triploide Zygote. Zu dem gleichen Ergebnis führt eine Störung in der Spermatogenese, bei der eine Haploidisierung ausgeblieben ist. Auch das Eindringen zweier normaler haploider Spermien in eine normale Eizelle ist in Betracht zu ziehen.

4. Strukturelle Chromosomenaberrationen kommen in weniger als 10 % in den Aborten des ersten Trimesters vor.

5. Mosaike sind ebenfalls relativ selten. Ihre Häufigkeit liegt ebenfalls unter 10 %.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß durchschnittlich 7 % aller Zygoten und 33 % bis 50 % aller Aborte Chromosomenaberrationen aufweisen (Röhrborn 1970). Die Inzidenz der Chromosomenanomalien in Spontanaborten ist abhängig vom Alter der Frucht. Im ersten Trimester wurden nach Carr (1971) 40 % aberrante Chromosomen unter den Aborten gefunden, wobei die präimplantativen Eiverluste nicht einbezogen sind, da sie klinisch nicht erfaßbar sind. Zwischen dem 90. und 120. Tag erniedrigt sich dieser Wert auf 25 %. Ruzicska und Czeizel (1970) wiesen dagegen unter 55 Spontanaborten des zweiten Trimesters 34 % Chromosomenaberrationen auf. Hierbei bestehen zu der Häufigkeit der Anomalien im ersten Trimester zwei wesentliche Unterschiede. Einerseits sind 40 % aller Chromosomenbefunde des zweiten Trimesters strukturelle Chromosomenaberrationen, die damit im zweiten Trimenon häufiger als im ersten Trimester auftreten, andererseits finden sich auch

mehr Chromosomenmosaike. Für Mosaike mit numerischen Chromosomenaberrationen kann eine Fehlverteilung während der mitotischen Teilung in der Embryonalentwicklung als Ursache angenommen werden. Die anderen strukturellen Chromosomenaberrationen des zweiten Trimesters, vor allem Translokationen und Deletionen, stammen von den Keimzellen und führen erst relativ spät zum Tod des Embryos. Nach dem 120. Tag findet man nur noch sehr wenige Chromosomenanomalien.

Jede Geburt ist das Ergebnis einer scharfen Selektion. Allein aufgrund der chromosomal aberranten Fehlgeburten errechnet werden mindestens 5 % aller Zygoten mit einer Chromosomenanomalie angelegt, aber unter den Geburten finden sich nur noch 0,5 % chromosomal aberrante Individuen. Alle anderen chromosomal aberranten Zygoten sind pränatal abgestorben (Röhrborn 1974).

Mutationstypen

Umwelteinflüsse physikalischer Art, wie zum Beispiel ionisierende Strahlen und UV-Licht, oder chemischer Natur, wie Arzneimittel, Lebensmittelzusätze usw., können zu schwerwiegenden Mutationen führen. Man kann folgende Mutationstypen unterscheiden:

1. Genmutationen. Sie finden im submikroskopischen Bereich statt. Nach Röhrborn (1970 b) werden alle sich phänotypisch auswirkenden Mutationen ohne mikroskopisch sichtbare Chromosomen- oder Chromatidenaberrationen von Zytogenetikern als Punktmutationen bezeichnet. Aus molekulargenetischer Sicht wird eine Punktmutation als Substitution, Deletion

oder Insertion einzelner Basenpaare angesehen.

2. Chromosomenaberrationen

a) numerische Chromosomenaberrationen. Sie sind definiert als eine Veränderung in der Anzahl der Chromosomen einer Zelle und führen zu Heteroploidien. Es sind entweder ganze Chromosomensätze vermehrt oder vermindert, oder die Zellen enthalten ein oder mehrere Chromosomen zuviel oder zu wenig (Aneuploidie).

b) strukturelle Chromosomenaberrationen ss. Hierunter versteht man alle mit zytogenetischen Untersuchungen mikroskopisch erkennbare Veränderungen an Chromosomen.

1. Gaps sind achromatische Lücken in den Chromosomen. Sie können vom Chromatid- oder Isochromatidtyp (Isolocusgap) sein. In den achromatischen Lücken können durch elektronenmikroskopische Untersuchungen Chromatidenfibrillen nachgewiesen werden (Brøgger 1971, Scheid und Traut 1971 a, 1971 b). Evans (1963 a, 1963 b) führte die Entstehung solcher Lücken auf lokale Entspiralisierungen der Chromosomen oder auf einen DNA-Verlust zurück. Im letzten Fall könnten daraus Chromosomenmutationen entstehen.

2. Chromatiden- und Chromosomenbrüche sind nach der Bruch-Reunionshypothese (Stadler 1931, Sax 1938, 1939, 1940, 1941; Rieger und Michaelis 1967) die Voraussetzung für echte Chromosomenmutationen.

3. Multiple Fragmentation von Chromosomen.

4. Chromosomenmutationen. Sie unterteilen sich in Duplikationen, Inversionen, Translokationen und Deletionen. Inversionen und Deletionen sind Intrachanges. Duplikationen und Translokationen können sowohl Inter- als auch Intrachanges darstellen. Alle Chromosomenmutationen sind Reunionsfiguren.

Einteilung der chemischen Mutagene

Bei der Menge der chemischen Mutagene, die sich einerseits in Form von Medikamenten in der Therapie, andererseits als Schadstoffe in der Umwelt des Menschen befinden, ist es ausgeschlossen, alle diese Substanzen hinsichtlich der möglichen mutagenen Wirkung zu überprüfen. Eine wesentliche Vereinfachung des Problemes wurde durch die Klassifizierung der chemischen Mutagene nach dem Gesichtspunkt gemeinsamer Beziehung zu Konstitution und Wirkungsweise erreicht. Nach Röhrborn (1960, 1962, 1965) kann folgende Einteilung als allgemein gültig angesehen werden:

1. Alkylierende Agentien. Diese hochreaktiven Verbindungen üben ihre Wirkung durch eine Übertragung von Alkylresten auf andere Moleküle oder Atome aus. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel die Dialkylsulfate: Diäthylsulfat, Dimethylsulfat und Dipropylsulfat. Eine Sonderstellung innerhalb dieser Gruppe nehmen die Radiomimetika ein. Hierzu zählen nur solche Substanzen, die mit ionisierenden Strahlen die gemeinsamen Effekte der Erzeugung von Chromosomenbrüchen und -mutationen, der zytostatischen

Wirkung, der kancerogenen Wirkung und der Depolymerisation von Nukleinsäure in vitro besitzen. Dies gilt zum Beispiel für S- und N-Loste, Epoxyde, Äthylenimine und Methylsulfonsäureester.

2. Basische Farbstoffe. Sie sind keine hochreaktiven Verbindungen wie die Radiomimetika, können jedoch ähnlich wie diese mit nukleophilen Gruppen in Nukleinsäure reagieren. Bei guten Resorptions- und Transportverhältnissen im Organismus wäre es daher denkbar, daß basische Farbstoffe in die Keimzellen gelangen und dort Mutationen auslösen könnten.

3. Peroxyde. Allgemein wirken Peroxyde schwächer mutagen als alkylierende Agentien. Als für die mutationsauslösende Eigenschaft bedeutungsvolle Wirkform der Peroxyde kommen vor allem Radikale in Betracht. Altenburg (1954) konnte in seinen Versuchen an Fiern von Drosophila eine starke Erhöhung der Mutationsfrequenz bei gleichzeitiger Applikation von UV-Licht und Peroxyden finden. Dies führte er auf eine die Bildung von Peroxyden katalysierende Wirkung des UV-Lichtes zurück. Butler und Conway (1953) wiesen einen Abbau von DNA durch photochemisch aus Hydroperoxyd gebildete Radikale nach. Sie vermuteten, daß die so gebildeten Radikale (vor allem OH^-) mit Nukleinsäuremolekülen durch Brüche der Zucker - Phosphat - Bindung, Oxidation des Zuckermoleküles, oder durch Lösen der Bindung zwischen Zucker und Base reagierten.

4. Antimetaboliten. Das sind Verbindungen, die durch Ver-

drängung natürlicher Stoffwechselprodukte biologische Reaktionen stören können. Sie besitzen in der Chemotherapie maligner Tumoren eine große Bedeutung. Sie werden in folgender Weise klassifiziert:

a) Verbindungen, die vermutlich auf die de novo Synthese von Purinen und Pyrimidinen wirken.
   1. Folsäureantagonisten (z. B. A-Methopterin)
   2. Glutaminsäureantagonisten (z. B. Azaserin)
b) Verbindungen, die wahrscheinlich die Inkorporation in Nukleinsäure beeinflussen.
   1. Purinantagonisten (z. B. Azaguanin)
   2. Pyrimidinantagonisten (z. B. Bromurazil)
c) Verbindungen, die wahrscheinlich als Aminosäureantagonisten wirken. (z. B. D, L-Ethionin)
d) Verbindungen mit fraglicher antimetabolischer Wirkung. (z. B. Urethan)

5. Sonstige Chemikalien. In dieser Gruppe sind vorläufig alle chemischen Stoffe erfaßt, die zur Zeit noch nicht in größeren Gruppen mit gleicher Konstitution und Wirkungsweise zusammengefaßt werden können. Allerdings sind schon einige gemeinsame Beziehungen unter Agentien dieser Gruppe erkannt. Untergruppen bestehen für Aldehyde und Radiochemikalien. Für einige radioaktive Isotope ist neben ihrer physikalischen Wirkung durch Strahlung eine gemeinsame chemische Beeinflussung des Erbgutes durch Inkorporierung in die Nukleinsäuren und Umwandlung der Isotope in die entsprechenden Zerfallsprodukte denkbar.

Acridine

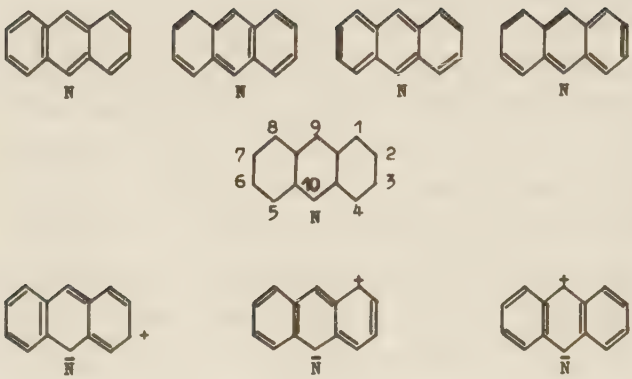
Zur Gruppe der basischen Farbstoffe gehört auch die Substanzklasse der Acridine, deren physikalische und chemische Eigenschaften, ihre technische und medizinische Verwendung an dieser Stelle ausführlicher dargestellt seien, weil die in dieser Arbeit verwendete Substanz Trypaflavin ein Acridinderivat ist.

Von der Entdeckung des Acridins im Jahre 1871 sind die Acridinfarbstoffe bis heute von wissenschaftlichem Interesse geblieben, und das nicht nur wegen ihrer ausgesprochenen Stabilität als Basen und Salze, ihres definierten Schmelzpunktes und ihrer leichten Kristallisationsfähigkeit, - eine Kombination von Eigenschaften, die bei Farbstoffen äquivalenten Komplexitätsgrades ungewöhnlich ist -, sondern vielmehr wegen ihrer nützlichen Applikationsmöglichkeiten.

Ab 1890 wurden verschiedenfarbige Acridine für die Farbstoffindustrie synthetisiert, die jedoch nur eine geringe Haltbarkeit besaßen. Zur Zeit werden die Acridine vor allem zur Färbung in der Lederindustrie verwendet.

Weniger bekannte Anwendungen der Acridine schließen die Isolation biologischen Materials und die analytische Bestimmung von Schwermetallen ein. Ihre Fluoreszens ist nützlich als Indikator für die Titration dunkelfarbiger Lösungen unter UV-Licht und in der Fluoreszensmikroskopie.

Abb. 1



Entsprechend der Summenformel $C_{13}H_9N$ besteht das Grundgerüst der Acridine aus drei Hexagonalen, deren korrekte Darstellung wie auch der Sitz der konjugierten Doppelbindungen aus der obigen Zeichnung zu ersehen ist. In der unteren Reihe der Zeichnung sind die möglichen Ladungsverteilungen infolge der wechselnden Besetzung der π -Orbitale durch die frei beweglichen Elektronen der konjugierten Doppelbindungen aufgeführt.

Die Acridine gleichen in ihrem Aufbau nach Untersuchungen von Baker (1933, zitiert nach Albert 1951) dem Anthracen, das in Röntgenuntersuchungen eine ebene Struktur der drei Hexagonale aufweist. Dies wird durch die Befunde über die identische Resonanzenergie und die Ähnlichkeit der

Absorptionsspektren von Anthracen und den Acridinen bestätigt.

Die Löslichkeit der Acridine in wässrigen Lösungen ist im allgemeinen gering. Mit zunehmender Anzahl der Aminogruppen nimmt die Löslichkeit ab, da sich einerseits durch die größere Anzahl von Aminogruppen eine größere Assoziationsfähigkeit ergibt, andererseits durch die Verbindung eines Wasserstoffatomes einer primären Aminogruppe mit dem Ringstickstoff die Häufigkeit der Anlagerung der OH^- Ionen des Wassers an den Ringstickstoff abnimmt. Wässrige Lösungen von Salzen der Acridine liegen in Form von Ion - Ion-Assoziaten vor. In verdünnter wässriger Lösung sind sie monomer, um bei höheren Konzentrationen in polymere Ionen, welche auch Micellen genannt werden, überzugehen. Der Umschlagspunkt, auch kritische micellare Konzentration genannt, liegt etwa bei 10^{-4} M. Die Micellen stehen mit den monomeren Ionen in einem einfachen thermodynamischen Gleichgewicht.

Die klinische Erprobung der Acridine begann 1888, als Auclert die medizinische Brauchbarkeit des Chrysanilines entdeckte, dessen analgetische und bei innerer Anwendung erscheinende mydriatische Wirkung er beschrieb. Die antibakterielle Wirkung der Acridine wurde 1910 von Ehrlich entdeckt, als er nach trypanoziden Mitteln suchte. Browning entdeckte 1913 die antiseptische Wirkung von Proflavin, welches zusammen mit Acriflavin als Wundbehandlungsmittel eingesetzt wurde. Aber erst während des ersten Weltkrieges

gelangten die Acridine durch die Einführung von Acriflavin und Proflavin als lokale Antiseptika Bedeutung in der medizinischen Praxis. 1930 wurde mit Atebrin ein wirksames Antimalariamittel in die klinische Medikation eingeführt. Lambliasis wurde 1937 wirksam mit Acranil behandelt. In der heutigen medikamentösen Therapie finden noch folgende Acridinderivate Anwendung:

a) Rivanol (2-methoxy-6,9-diaminoacridinlactat): lokales Desinfiziens zur äußeren Anwendung
b) Panflavin und Panflavit (enthalten 3 mg Trypaflavin/Tablette); Flavamed (enthält 2 mg diamino-methylacridinchlorid/Tablette): gegen Mund- und Racheninfektionen.
c) Amoebin (0,22 g methoxy-diaminoacridinlactat/Tablette); Acranil (0,1 g dihydroxychlorid des chloromethoxyacridylaminodiäthylaminopropanol/Tablette): gegen Magen- und intestinale Infektionen.
d) Choleflavin (18 mg Trypaflavin/Tablette); Chol - Pillen (2,5 mg Acriflavinchlorid/Tablette): als Desinfiziens der Gallenwege (zitiert nach Buchinger 1970).

Trotz der großen Bedeutung der Sulfonamide und des Penicillins werden auch heute noch die Acridine zur lokalen Wundbehandlung angewendet. Ihre Aktivität wird durch anwesendes Serum nicht beeinflußt. Sie sind wirksam gegen alle in gewöhnlichen Wunden vorkommende Gram- positiven und Gram- negativen Erreger, wobei die Letzten sich als weniger empfindlich gegenüber Acridinen verhielten. Die Acridine besitzen auch baktericide Wirkungen, jedoch

scheint der Grad der Ionisation der Acridine für die baktericide Eigenschaft nicht so ausschlaggebend zu sein wie für die bakteriostatische Wirkung. Eine Resistenzbildung gegen Acridine ist bisher unbekannt.

Die biologische Wirksamkeit der Acridine ist abhängig von ihrer Basenstärke. Diese nimmt mit dem Prozentsatz der Kationisierung bei einem gegebenen pH zu. Als gebräuchliches Maß der Basenstärke gilt der pK_a bei 25°C, wobei höhere Werte des pK_a einer stärkeren Basizität entsprechen. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der molekularen Struktur und dem Grad der Ionisation. Die Basenstärke der Acridine nimmt mit steigender Anzahl der insbesondere in Position 3 und 9 des Grundkörpers eingeführten NH_2-Gruppen und der Quaternisierung des Ringstickstoffes zu. Möglicherweise stabilisieren die eingeführten NH_2^+ = Gruppen durch ihre elektronenabweisende Eigenschaft den Grundkörper. Der kritische Wert des pK_a hinsichtlich der bakteriostatischen Wirkung liegt bei 7,3. Alle Basen mit schwachem bakteriostatischem Effekt besitzen $pK_a \leq 7{,}3$ und sind nur zu etwa 33 % kationisiert. Aus dieser Sicht dürfen Rivanol mit einem pK_a = 11,10 und Proflavin mit einem pK_a = 9,3 als relativ starke Basen angesehen werden (Albert 1951, 1966). Andere Autoren berichten von Wirkungen der Acridine gegen Viren, Phagen und Rickettsien.

Die Basenstärke nimmt mit jedem Temperaturanstieg und jeder Erhöhung des pH Wertes ab. Für einen wirkungsvollen bakteriostatischen Effekt der Acridine ist eine Ionisie-

rung von 50 % und mehr bei 37°C notwendig. Die Ionisation muß kationischer Art sein, da Anionen und Zwitterionen der Acridine sich als unwirksam erwiesen (Anionen sind herstellbar durch die Einführung saurer Gruppen in schwach basische Acridine. Eine Einführung dieser Gruppen in stärkere Acridinbasen führt zur Bildung von Zwitterionen.). Albert vermutete, daß die bakteriostatische Wirkung der Acridine durch eine Blockierung anionischer Rezeptoren an der Außenseite der Mikroorganismen durch ihre Kationen erfolgen könnte, wodurch die vitale Funktion des Anions blockiert wird. Die Bindung des Acridinkations an das Anion, welches laut Albert auf einem Nukleoprotein zu sitzen scheint, sollte sowohl durch eine Ionenbindung als auch infolge des flachen Aufbaues der Acridine mögliche Summation multipler van der Waals-Bindungen erfolgen.
Toxische Effekte hoher Dosen von Acridin zeigten sich in zentraler Paralyse, wobei zuerst die unteren Extremitäten und dann erst die übrige Körpermuskulatur befallen war. Atemstörungen erstreckten sich von leichter Dyspnoe bis zum totalen Atemstillstand.
Autopsien verstorbener Patienten, die mit Acriflavindosen nahe der Toxizitätsgrenze behandelt worden waren, ergaben Leberatrophien, Ulzerationen des Duodenums, akute fettige Degeneration der Nieren und Glomerulonephritiden. Nieren, Gastrointestinaltrakt, Muskulatur und Knochenmark waren am stärksten angefärbt. Liquor und Gehirnsubstanz färbten sich dagegen nicht an.

Geringere Dosen stimulierten das Herz und die periphere vasomotorische Regulation. Zeitweise traten Nausea und Erbrechen auf (Albert 1951).

Ziele und Methoden der Mutagenitätsforschung

Die Ziele einer Untersuchung über mögliche mutagene Wirkungen einer Substanz lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Besitzt die Substanz überhaupt eine mutagene Wirkung? Wenn ja, welcher Art ist sie?
2. Wie stark ist die menschliche Bevölkerung gegenüber dem Mutagen exponiert; verteilt sich die Exposition gleichmäßig auf die gesamte Bevölkerung, oder sind bestimmte Subpopulationen besonders betroffen?
3. Mit welchem Anstieg der spontanen Mutationsrate muß gerechnet werden?
4. Welches sind auf die Dauer die Konsequenzen für die Bevölkerung als Ganzes und ihre einzelnen Mitglieder?

Das Fernziel der Untersuchung auf Mutagenität ist die Beantwortung aller vier Fragen. Das Nahziel ist jedoch die Beantwortung der ersten Frage. Diese Frage nach Ausmaß und Art der mutagenen Wirkung kann folgendermaßen untergliedert werden:

a) Welche Art von Mutationen wird durch die Verbindung induziert? Sind es numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen oder Genmutationen?
b) In welchen Zellen werden die Mutationen ausgelöst? In den Keimzellen oder außerhalb der Keimbahn? Gibt es eine Spezifität für einzelne Entwicklungsstadien der Zellen?
c) Welches ist das Schicksal der Mutationen? Erreichen

die Keimzellen mit Mutationen die nächste Generation? Wie lange überleben die Mutationen enthaltenden somatischen Zellen?

d) Welches ist die phänotypische Auswirkung der Mutationen auf das Individuum? Führen sie zum Abort, zur Geburt von Mißbildungen, haben sie Folgen für die Gesundheit, Leistungsfähigkeit oder das Verhalten ihrer Träger, oder werden sie überdeckt und im Phänotyp unbemerkbar an die folgenden Generationen weitergegeben? (nach Vogel, Röhrborn und Hansmann 1974).

Zur Beantwortung dieser Fragen stehen verschiedene Testsysteme beim Säuger zur Verfügung. Die Methoden zum Nachweis chromosomaler Veränderungen und phänotypischer Auswirkungen, die sich auf Veränderungen am genetischen Material zurückführen lassen, sind aus den folgenden Tabellen ersichtlich. Im allgemeinen lassen sich die vielfältigen Möglichkeiten der mutagenen Wirkung chemischer Agentien beim Menschen nicht untersuchen. Zwar ist es möglich, in Lymphozyten, Knochenmarkzellen, Fibroblasten und anderen Geweben die Chromosomen von Menschen zu untersuchen, wenn sie aus therapeutischen Gründen mit Arzneimitteln behandelt wurden oder bestimmten Umweltnoxen in besonderer Weise ausgesetzt waren, gezielte Mutationsexperimente am Menschen sind jedoch nicht durchführbar. Insbesondere die Untersuchung der männlichen und weiblichen Keimzellen, deren Bedeutung schon Anfang dieses Kapitels dargestellt ist, gestaltet sich beim Menschen recht schwierig. Zwar ist man in der Lage, Spermatogenesezellen, die aus Hodenbiopsien gewonnen wurden, oder Oocyten, die mit relativ

großem Aufwand aus den Ovarien extrahiert werden können, cytogenetisch zu untersuchen, jedoch stehen diesen Untersuchungen ethische Gründe gegenüber, so daß derartige Untersuchungen nur vorgenommen werden sollten, wenn ohnehin eine Testbiopsie bzw. eine partielle oder totale Ovarektomie durchgeführt wird. Deswegen ist man auf andere Versuchsobjekte angewiesen. Um Extrapolationen von zu verschiedenen Testsystemen auf den Menschen zu vermeiden, scheiden Mikroorganismen und andere morphologisch und biochemisch vom Menschen zu unterschiedliche Organismen als Versuchsobjekte aus. Man ist deswegen auf Säugetiere angewiesen. Hier bietet sich die Maus speziell an, da sie

1. relativ billig in großer Anzahl gehalten werden kann,
2. eine rasche Generationsfolge hat,
3. genetisch gut bekannt ist,
4. von ihr Inzuchtstämme als Quellen genetisch homogenen Tiermaterials zur Verfügung stehen und
5. ein quantitativer Vergleich mit strahlengenetischen Ergebnissen möglich ist.

Extrapolationen zwischen der Wirkung am Versuchsobjekt und der möglichen Wirkung beim Menschen, von einem Mutationstyp auf den anderen, von einem Gewebe auf das andere, von einem Entwicklungsstadium der Zelle zum anderen und von höheren auf niedere Dosen sind in der Bewertung der Ergebnisse oft problematisch.

Bei der Untersuchung der Geschlechtszellen der männlichen

und weiblichen Maus, wie sie von Baldermann (1967) und Baldermann et al. (1967) bzw. Brucklacher (1969) mit dem in dieser Arbeit verwendeten Acridinderivat Trypaflavin durchgeführt wurde, erwies sich Trypaflavin als ein chemisches Agens mit schwach mutagener Wirkung. Sie führten diese Untersuchungen mit dem dominanten Letaltest durch, dessen Durchführungsweise und Problematik im Kapitel III, ausführlicher dargestellt sind.

Tab.1: Methoden zur Mutagenitätstestung beim Säuger (aus: Vogel,Röhrborn und Hansmann, Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität, 1974.)

Methode	Ziel der Methode	Beurteilung der Methode: Grenzen der Methode	Beurteilung der Methode: Kritisch f. welches Problem?	Literatur
a) Methoden zum Nachweis chromosomaler Veränderungen				
I. Männliche Keimzellen				
1. In Spermatogonien	Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen in Mitosen von (vor allem späten) Spermatogonien	1. Nachgewiesene Mutationen können in d. Meiose eliminiert werden	Werden numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen in männlichen Keimzellen ausgelöst?	Evans et al. (1964) Hoo, Bowles (1971) Schleiermacher (1966a, 1970)
2. Während Metaphase I 3. Während Metaphase II	Nachweis (numerischer u.) struktureller Chromosomenaberrationen sowie (in I. meiotischer Teilg.) von Univalenzen	1. Nicht alle Strukturanomalien sind erkennbar 2. Univalenzen sind genetisch schwer zu deuten		
II. Weibliche Keimzellen				
1. In Oogonien	Nachweis (numerischer u.) struktureller Chromosomenaberrationen	1. Methode noch sehr unentwickelt 2. Zellen können vor Befruchtung absterben	Werden numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen in weiblichen Keimzellen ausgelöst? Besonders geeignet zur direkten Analyse von Non-Disjunction-Prozessen während der 1. bzw. 2. meiot. Teilg.	Röhrborn u. Hansmann (1971)
2. Während Metaphase I	Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen sowie von Univalenzen	1. Nicht alle Aberrationen sind erkennbar 2. Univalenzen sind genetisch schwer deutbar		
3. Während Metaphase II und im Vorkernstadium	Nachweis struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen	1. Bestimmte Strukturaberrationen sind schwer erkennbar		
III. Embryonalentwicklung				
1. Vor der Implantation (Furchungsstadium) 2. Nach der Implantation (überlebende Embryonen)	Nachweis numerischer u. struktureller Chromosomenabegrationen	1. Die Zygote kann vor oder nach der Implantation absterben	Auftreten von Chromosomenaberrationen, die in Keimzellen ausgelöst wurden, im Embryo (vor bzw. nach der Implantation)	Hansmann, Röhrborn (1973) Rohrborn et al. (1971) Datta, Frigger u. Schleiermacher (1970) Tarkowski (1966)
IV. Nach der Geburt				
1. Knochenmark 2. Fibroblasten 3. Lymphozyten 4. Andere Gewebe	Nachweis numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen	1. (bei Behandlg. des Tieres selbst) Extrapolation von somatischen Zellen auf Keimzellen 2. (bei Behandlg. von Menschen) Extrapolation von somatischen auf Keimzellen 3. (bei der Frage der somatischen Mutation) u. U. Extrapolation von einem somatischen Gewebe auf das andere	1. (bei Keimzell-Behandlung) Auftreten von Chromosomenaberrationen in Geweben des E_1-Tieres 2. (bei Behandlg. des Tieres selbst oder des Menschen) Auftreten von Chromosomenaberrationen in bestimmten somatischen Geweben	Anders, De Jong (1972) Cohen, Hirschhorn (1971) Schmid et al. (1971) Datta, Frigger u. Schleiermacher (1970)
5. Knochenmark (Kernanomalietest)	Nachweis von Kernveränderungen	4. (nur bei 5.) Extrapolation von Kernveränderungen auf Chromosomen-		Schroeder (1970) Boller, Schmid (1970)

Tab.2:Methoden zur Mutagenitätstestung beim Säuger (aus:Vogel,Röhrborn und Hansmann, Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität, 1974)

Methode	Ziel der Methode	Beurteilung der Methode: Grenzen der Methode	Beurteilung der Methode: Kritisch für welches Problem?	Literatur
b) Methoden zum Nachweis phänotypischer Wirkungen, die sich auf Veränderungen am genetischen Material zurückführen lassen				
I. Männliche Keimzellen				
1. Histologisch nachweisbare Zellveränderungen bis zum Zelluntergang im Keimgewebe	Nachweis histologischer Veränderungen	1. Die histologischen Veränderungen sind unspezifisch (müssen keine genetischen Gründe haben) 2. Auch bei genetischer Ursache können zerstörte Keimzellen nicht an F_1 gelangen	Die Methode ist, abgesehen von Sterilität, für keinen genetisch relevanten Effekt kritisch	Schleiermacher (1970)
II. Weibliche Keimzellen				
1. Zellveränderungen (z. B. Zelluntergang) an Oogonien und Oozyten	Nachweis des Untergangs einzelner Zellen	1. Veränderungen sind unspezifisch 2. Auch bei genetischer Ursache können zerstörte Keimzellen nicht an F_1 gelangen	Die Methode ist, abgesehen von Sterilität, für keinen genetisch relevanten Effekt kritisch	Baker (1971) Oakberg (1968)
III. Embryonalentwicklung				
1. Zählung von Blastomeren und Nebenkernen in frühen Furchungsstadien	Nachweis einer Entwicklungsstörung des Embryos	1. Extrapolation allgemeine Keimschädigung → genetische Schädigung	Die Methode ist nicht kritisch, gibt aber zusätzliche Information zur Wirkung von Mutagenen auf den Phänotyp des frühen Embryos	Hansmann, Röhrborn (1973)
2. Zählung von präimplantativen Eiverlusten (Differenz zw. Corpora lutea graviditatis u. Implantaten)	Nachweis des Todes von Embryonen („dominante Letale")		Die Methode ist kritisch für den Tod im Embryonalalter als phänotypische Folge genetischer Schädigung (bes. Vorteile: Sie ist gut durchgearbeitet und erfordert relativ geringen Einsatz an Zeit, Geld und spezialisierter Arbeitskraft)	Röhrborn (1968, 1970)
3. Zählung der Deciduomata				
4. Zählung der sichtbaren abgestorbenen Embryonen („Spätstadien")				
IV. Nach der Geburt				
1. Verminderung der Wurfgröße	Fertilitätsmessung	Kein direktes Kriterium für genetische Effekte	Fertilitätssenkung	
2. Nachweis „dominanter" Veränderungen im Phänotyp des Gesamttieres (F_1) (z. B. am Skelett)	Nachweis der Wirkung „dominanter" Neumutationen (einschl. kleiner Chromosomenveränderungen)	1. Kriterium etwas subjektiv, was schwer wiegt, da man bei multiparen Tieren auch im Blindversuch erkennt, ob das Tier aus Versuch oder Kontrolle stammt.	Kritisch (mit Einschränkungen) für die Vermehrung einiger dominanter Mutationen mit sehr deutlichem phänotypischem Effekt	Ehling (1965, 1970) Röhrborn, Vogel (1969)
3. Multiple Locus-Methode	Nachweis von 7 definierten rezessiven Mutationen	1. Aussage ist auf kleine Auswahl von Mutationen beschränkt 2. Es müssen nicht Punktmutationen sensu stricto sein	Kritisch (mit wenigen Einschränkungen) f. d. Auftreten von Genmutationen, insbesondere rezessiven. Als einzige kritische Methode dieser Art trotz großen Aufwandes von hohem Wert	Russell (1951) Ehling (1970)
4. Nachweis von Sterilität u. Semisterilität in der F_1	Nachweis von Translokationen	1. Methode wenig sensibel	Nicht kritisch-direkte Methoden sind vorzuziehen!	Cattanach (1957)
5. Nachweis von Verhaltensänderungen i. d. F_1	Nachweis des Eingriffes unbestimmter Mutationen in ein multifaktorielles	1. Befunde sind genetisch schlecht definiert	Noch nicht kritisch, hier sollte aber Forschungsarbeit einsetzen!	Newcombe, McGregor (1964)

II. Literaturbefunde über Reaktionsmechanismen und mutagene Wirkungen der Acridinderivate

Über den möglichen Wirkungsmechanismus der Acridine sind von verschiedenen Autoren Untersuchungen an den unterschiedlichsten Objekten gemacht worden. Der Acridineffekt wird allgemein darauf zurückgeführt, daß die Farbstoffmoleküle die DNA,bzw. die DNA-Synthese und damit auch die, von der DNA codierten Proteine verändern oder schädigen.

So führte auch Stich (1951) auf Grund seiner Untersuchungen an Mäusegeweben, Condylostoma speciale und Acetabularia mediterranea die Wirkung von Trypaflavin an der lebenden Zelle auf eine Schädigung der DNA zurück. Folgende Befunde sprachen für diese Annahme:

1. Die DNA geht in vitro mit Trypaflavin eine stabile, salzartige Verbindung ein.
2. Nach der Applikation von Trypaflavin macht sich eine Zellschädigung an den Chromosomen bemerkbar.
3. Trypaflavin wird in DNA haltigen Chromosomenteilen (z. B. nur in den Querbanden von Riesenchromosomen) gespeichert.
4. Der Trypaflavineffekt kann durch gleichzeitig verabfolgte DNA - Gaben aufgehoben werden.

Andererseits wurde jedoch auch deutlich, daß Trypaflavin die RNA angreift, da die kernlosen Teile von Acetabularia mediterranea, die sich durch Cytoplasmavermehrung teilen, in ihrer Regenerationsfähigkeit durch Trypaflavin gehemmt werden.

1. Genmutationen

Gräslund et al. (1969) berichteten über die Bildung freier Radikale, wenn die DNA durch Acridine, wie Acridinorange und Proflavin, photosensibilisiert und anschließend lichtexponiert wird. Sie fanden eine enge Korrelation zwischen der Bildung der Radikale (ausgedrückt durch das Verhältnis der Farbstoffmoleküle/DNA - Abschnitt) und der monomeren Bindungsform der Farbstoffmoleküle an die DNA. Diese freier Radikale sollten besonders an den Stellen der DNA gebildet werden, die A - T reich sind, und sich mit eben diesen Basen verbinden. Acriflavin bindet sich bevorzugt an A - T reiche Bezirke der DNA (Michenkova und Tumerman 1965), was die Möglichkeit der bevorzugten Bildung der Radikale an diesen Stellen erklären mag. Die weiteren Reaktionen der Radikle führen laut Gräslund zu Veränderungen der elektronischen Struktur bestimmter Basen (besonders Thymin). Dies wiederum könnte zu einer Veränderung des Verhaltens der Basen während späterer Paarungen führen.

Freese (1959 a, b; 1971) stellte für den rII Locus des T4 Phagen aufgrund der Unterschiede zwischen zum Wildtyp rückrevertierenden Mutanten, je nachdem, ob sie durch Basenanaloge induzierbar sind oder nicht, zwei unterschiedliche Arten mutagener Effekte fest:

1. Ein mutagener Effekt, durch den die Basenanaloge Vorwärtsmutationen und deren Reversionen induzieren. Typische Vertreter dieser Gruppe sind 5 - Bromdesoxyuridin (BU) und 2 - Aminopurin (AP).
2. Ein mutagener Effekt, welcher verantwortlich ist für

die Bildung und Reversion solcher Mutanten, die nicht durch Basenanaloge induziert werden können. Ein typischer Vertreter dieser Gruppe ist Proflavin (PF).

Weil ungefähr 10 % der spontanen Mutationen durch Basenanaloge revertiert werden können, sind diese 10 % der spontanen Mutationen laut Freese durch den ersten der beiden postulierten mutagenen Effekte entstanden und 90 % durch den zweiten Effekt. Eine Mutante, die durch die Wirkungen von Basenanalogen erzeugt wurde, ist auch nur durch Vertreter dieser Gruppe revertierbar. Das ist ebenso für die Mutationen gültig, die durch den mutagenen Effekt der zweiten Art entstanden sind. Die zwei verschiedenen mutagenen Effekte hängen, so Freese, mit zwei unterschiedlichen Veränderungen in der DNA während der Replikation des neu entstehenden Stranges am schon vorhandenen komplementären Strang zusammen:

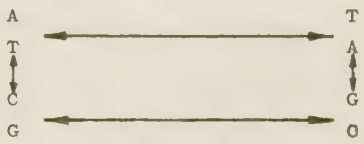
ad 1: Mutationen, die durch Basenanaloge induziert wurden, treten wahrscheinlich durch fehlerhafte Basenpaarung während der Replikation oder nachher, wenn ein Basenanaloges in die DNA inkorporiert ist, auf. Ein Purin wird jedoch immer wieder durch ein Purin, ein Pyrimidin durch ein Pyrimidin, ersetzt. Die in der folgenden Zeichnung aufgeführten Veränderungen nannte Freese "Transitionen":

Abb. 2:

A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin

Es ist wahrscheinlich, daß jedes Basenanaloge die "Transitionen" in beiden Richtungen ausführen kann. Es erscheint jedoch auch möglich, daß verschiedene Basenanaloge Veränderungen bevorzugt in eine Richtung induzieren. Dies erklärt, warum zum Beispiel 5 - Bromdesoxyuridin induzierte Mutanten zu Reversionen tendieren, die mehr durch 2 - Aminopurin als durch 5 - Bromdesoxyuridin induzierbar sind und umgekehrt für die 2 - Aminopurin induzierten Mutanten.
ad 2: Eine einfache Erklärung des mutagenen Effektes der zweiten Art ist, laut Freese, dadurch möglich, daß eine "Transversion" eines Nukleotidpaares durchgeführt wird, indem ein Purin gegen ein Pyrimidin und umgekehrt ersetzt wird. Hieraus resultiert zusätzlich zu der Schwierigkeit der Basenpaarung eine Formveränderung der DNS, weil ein in die Helix eingebautes Purinpaar den Durchmesser des Moleküles erhöhen würde, während ein Pyrimidinpaar denselben erniedrigen würde. Deshalb können die unten aufgeführten Transversionen zu Genmutationen führen. Transversionen können durch eine Falschpaarung eines Purins mit einem anderen Purin oder mit einer Lücke in der DNA, die durch eine Depurination entstanden ist, oder durch einen Fehler in der Paarung eines Pyrimidins mit einem anderen Pyrimidin entstehen. (Michaelis und Rieger 1976).

Abb. 3:



A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin,

Die mögliche Reihenfolge der Veränderungen in der DNA, welche zu Transversionen führen können, ist in der folgender Abbildung dargestellt. Während der DNA-Replikation kann sich ein Purin leicht mit einem weiteren Purin bzw. ein Pyrimidin mit einem anderen Pyrimidin paaren, und die falsche Base kann so in die DNA eingebaut werden. In der nächsten Replikation geht jede einzelne Base mit ihrem normalen Partner eine Bindung ein, und so ist der Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase und umgekehrt durchgeführt.

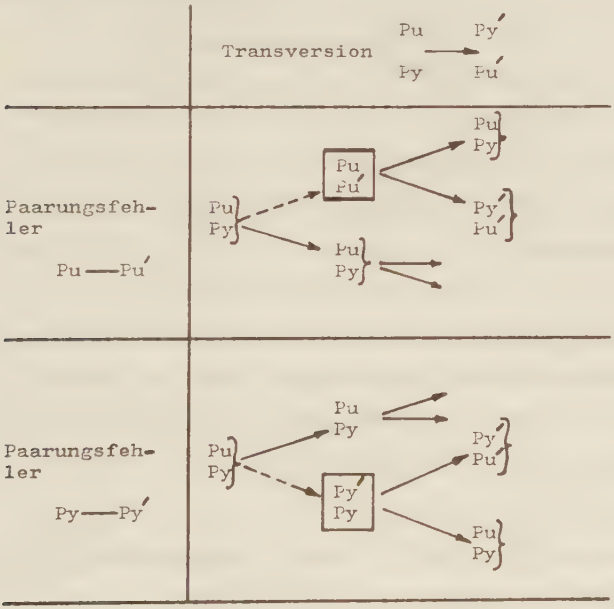


Abb. 4: aus Freese, The difference between spontaneous and baseanalogue induced mutations of phage T4.1959b.

Da basenanalog induzierte Mutanten nicht durch Acridine zum Revertieren gebracht werden können, folgt, daß eine "Transition" nicht durch eine "Transversion" revertiert werden kann und umgekehrt. Laut Freese kann die Inkorporation einer falschen Base in manchen Fällen das jeweilige Ende des wachsenden DNA Stranges derart aus der Wachstumsrichtung beugen, daß eine weitere Replikation schwierig, oder gar unmöglich ist.

Lerman (1961, 1963, 1964 a, 1964 b) gelang es, die Struktur des DNA-Acridin-Komplexes aufzuklären. Er stellte die unten aufgezeichneten Möglichkeiten von Acridinbindungen an die DNA zur Diskussion und isolierte durch eine Reihe von Untersuchungen das einzig mögliche, mit den Untersuchungsergebnissen übereinstimmende Modell des DNA-Acridin-Komplexes. In der Zeichnung sind die Acridinmoleküle schwarz ausgemalt. Die DNA unterteilt sich in die horizontalen, senkrecht zur Achse der DNA-Doppelhelix liegenden, untereinander durch Wasserstoffbrückenbindung miteinander verbundenen Basenpaare und die beiden, sich spiralig um diese Basenpaarachse drehenden, parallel zueinander verlaufenden Zucker-Phosphat-Stränge.

ad Modell 1: Proflavin ist in einer äußeren Bindung parallel zur Helixachse an die DNA angeordnet, ohne deren normale Struktur zu stören.

ad Modell 2: Die äußere Bindung des Proflavins führt hier zu einer Veränderung der DNA-Struktur im Sinne einer 50 %igen Extension der Zucker-Phosphatketten und einer Schräglage der Basenpaare gegenüber der Helixachse von 45 %.

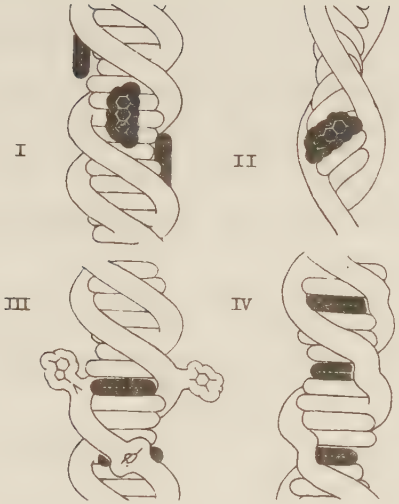


Abb. 5: Modelle der möglichen Struktur des DNA-Acridin-Komplexes. Aus: Lerman, Acridine mutagens and DNA - structure, 1964

ad Modell 3: Proflavin wird hier anstelle eines Basenpaares in das Gerüst der Basenpaarkette senkrecht zur Helixachse eingelagert. Gleichzeitig sollen die beiden, durch Proflavin verdrängten Basen nach außen gedreht werden, wie es von Fresco und Alberts (1960) vorgeschlagen wurde.

ad Modell 4: Proflavin wird in eine Lücke der Basenpaarkette senkrecht zur Helixachse eingelagert. Die Lücke entsteht durch ein lokales Aufdrehen und Strecken der beiden Ribose-Phosphat-Schleifen, infolge dessen eine Trennung der vorher eng anliegenden Basenpaare mit Lückenbildung möglich wird, ohne die normale Wasserstoff-

brückenbindung zwischen den Basen zu stören.

Diese Modelle sind entsprechend ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften folgendermaßen zu kategorisieren:

1. Beide Modelle auf der linken Seite der Skizze enthalten pro Längeneinheit die Elektronen und die Masse des Acridines zusätzlich zu der Masse und Elektronenzahl der DNA.

2. Die Modelle der rechten Seite sind soweit gestreckt, daß ihre Massen und Elektronenzahl pro Längeneinheit sogar geringer sind als die der normalen DNA.

3. Das untere Paar der Modelle enthält die gebundenen Acridinmoleküle senkrecht zur Helixachse.

4. Oben links und unten rechts behalten die Basenpaare ihre nahezu senkrechte Stellung zur Helixachse bei, während die anderen Modelle die Basen entweder schräg oder nach außen gedreht enthalten.

5. Das obere Paar enthält Proflavin in äußerer Bindung; das bedeutet, daß eine Seite des Proflavins in Kontakt mit der DNA, die andere aber in Kontakt mit dem Lösungsmittel ist, während im unteren Paar nur die Ecken, d.h. die Wasserstoffatome der Acridinmoleküle mit dem Lösungsmittel in Verbindung treten könnten.

Mit folgenden Untersuchungen eliminierte Lerman das einzig mögliche Modell der Acridin-DNA-Bindung, nämlich das in der obigen Zeichnung als Modell 4 aufgeführte:

1. Massen- und Elektronenzahlbestimmung pro Längeneinheit der DNA: diese Untersuchungen wurden aufgrund der Veränderung des Sedimetationskoeffizienten der normalen DNA

und des DNA-Acridin-Komplexes durchgeführt. Dabei wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Röntgenuntersuchungen von Luzzati et al. (1961) deutlich, daß mit steigender Anzahl der an die DNA gebundenen Acridinmoleküle ein deutlicher Abfall der Elektronenzahl und Masse pro Längeneinheit erfolgte. Dieses Ergebnis führt die, mit den beiden linken Modellen verbundene Theorie ad absurdum, bei denen sich die Masse der Acridinmoleküle zur Masse der DNA addieren würden.

2. Dichroismus des DNA-Acridin-Komplexes in fließender Lösung: Unter Dichroismus, wegen der Abhängigkeit der Absorptionsfarben von der Schwingungsrichtung auch Pleochroismus genannt, versteht man das Phänomen, daß farbige Kristalle bei der Reflektion polarisierten weißen Lichtes eine andere Farbe zeigen als im transmittierten Licht. Purine und Pyrimidine absorbieren bei 260 mμ nach der Bedingung $\cos^2 \varphi$ Licht, wobei φ den Winkel zwischen dem elektrischen Vektor der Lichtquelle und dem, in der Ebene der Basenpaare liegenden Farbstoff bezeichnet. Es zeigt sich, daß sie am meisten Licht absorbieren, wenn sie senkrecht zur Polarisationsebene des einfallenden Lichtes liegen, was mit einem Farbstoffumschlag verbunden ist. Die parallele Ausrichtung der in Lösung befindlichen DNA erreicht man, indem man eine hochpolymere DNA-Lösung unter Druck durch eine Kapillare fließen läßt. Quinacrin beladene DNA wies unter diesen Bedingungen eine Erhöhung des Dichroismus auf. Dies spricht für eine strenge Ausrichtung der Acridine senkrecht zur Helixachse der DNA.

3. Untersuchung der Fluoreszenz des DNA-Acridin-Komplexes in fließender Lösung: Auch hier ergab sich eine nahezu senkrechte Anordnung der Acridine zur Achse der DNA-Doppelhelix, erforscht anhand des Winkels zwischen dem, von dem fluoreszierenden Farbstoff emittierten Licht und der Ebene des Polarisationsfilters.

4. Untersuchungen über die Abschwächung eines elektrophilen Angriffes durch sterische Faktoren: Bei Erforschungen der Diazotisation von Acridinen, DNA-Acridin-Komplexen und Verbindungen von Acridinen mit verschiedenen anderen Polyanionen zeigte sich, daß die Diazotisation (NH_2^+-NO) der NH_2-Gruppen des Farbstoffes durch die Bindung an die DNA um etwas weniger als das Zwanzigfache gegenüber ungebundenen Acridinen abnimmt, während eine Bindung der Acridine an andere Polyanionen eine Verringerung der Diazotisation bis maximal 50 % erreichte. Erklärbar ist dies nur durch die unten beschriebene Interkalation der Acridine in die DNA, wie es in Modell 4 gezeigt ist.

Durch ein örtlich begrenztes Entspiralisieren und Strecken der Desoxyribosebänder entsteht eine Lücke im Achsenskelett der Basenpaare. Diese Lücke entspricht in ihrer Größe genau der Dicke eines Basenpaares oder eines ganzzähligen Vielfachen. In diesen Zwischenraum werden die Acridine, deren Dicke derjenigen der Basenpaare entspricht, interkaliert. Die Farbstoffmoleküle liegen in der Ebene der Basenpaare beinahe senkrecht zur helikalen Achse, wie es bei den Untersuchungen des Dichroismus und der Fluoreszenzstrahlung nach-

gewiesen werden konnte. Die Interkalation der Acridine erfordert, daß das Desoxyribosephosphatband, welches zwei Basen mit einer Rotation im Uhrzeigersinn von 45° und einem Fortschritt in Richtung der helikalen Achse von 3,36° verbindet, sich auf das Doppelte ausstreckt. Folglich beträgt die basenverbindende Rotation durch eine Entspiralisierung der Bänder nur noch 36°, und die Längenausdehnung in Richtung der Achse zwischen zwei Basenpaaren streckt sich von 3,36Å auf 6,85Å. Diese Resultate stimmen mit den Bindungslängen und Winkeln, wie sie von Rich et al. (1961) und Langridge et al. (1960) festgestellt wurden, überein. Das Acridinmolekül ist in der Gestalt eines Sandwiches sowohl von oben als auch von unten mit je einem Basenpaar 'belegt'. Die Wasserstoffbrückenbindungen der Basen bleiben durch die Interkalation völlig ungestört. Wie bei den Untersuchungen der Masse und Elektronenzahl pro Längeneinheit der DNA gezeigt werden konnte, sind diese beim DNA-Acridin-Komplex vermindert, da die Acridine nur halb so schwer sind wie normale Basen. Zusätzliche Effekte der Acridininterkalation sind eine Erhöhung der Viskosität und eine Stabilisierung der Helix. Da die thermische Stabilisation der DNA elektrostatischer Natur ist, ist es von wesentlichem Interesse, daß die Acridine nur eine positive Ladung pro interkaliertem Molekül in die DNA einlagern. Die Erhöhung der notwendigen Temperaturzufuhr zur Denaturierung des DNA-Acridin-Komplexes ist darauf zurückzuführen, daß die zusätzliche Energie benötigt wird, zusätzlich zur Trennung der normalen DNA-Stränge die Acridine von der Helix zu separieren. Zu den

gleichen Ergebnissen gelangte auch Riva (1966). Durch die Interkalation der Acridine erfolgt eine weitgehende Abschirmung der Farbstoffmoleküle vom direkten Kontakt mit dem umgebenden Medium. Nur die Ecken der Wasserstoffatome der Acridine können noch Bindungen eingehen. Die Konfiguration der Acridine in der Lücke des DNA-Achsenskelettes konnte zwar von Lerman (1964) nicht näher spezifiziert werden, trotzdem erscheint die Projektion der folgenden Zeichnung plausibel.

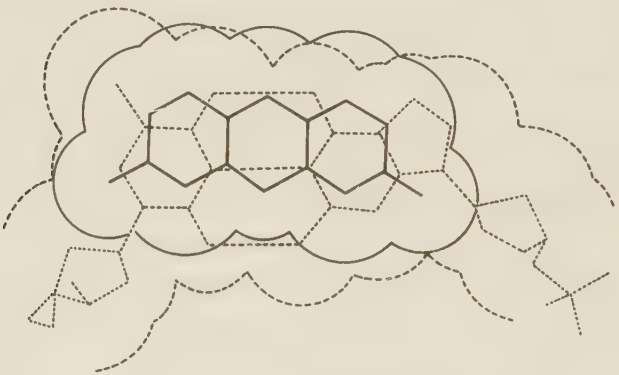


Abb. 6: Projektion des Acridinmoleküles in der DNA.
Aus: Lerman, Acridine mutagens and DNA-structure, 1964.

Das Acridinmolekül bringt hier seine NH_2-Gruppen so nahe wie möglich an die Ringoxygene der Desoxyribose heran, wobei der Sauerstoff am Ring der rechten Base unterhalb und der Sauerstoff des Ringes der linken Base oberhalb des Acridinmoleküles liegt. Das oberhalb des Farbstoffs liegende Basenpaar ist nicht eingezeichnet, aber es würde nahezu

genau über dem unteren Basenpaar liegen, nämlich um nur 9° gegen den Uhrzeigersinn um die Helixachse gedreht. Die van der Waals - Strukturen der Basen schließen die Aminogruppen der Acridine in sich ein, so daß deren Reaktivität mit dem umgebenden Medium stark abgeschwächt ist. Bei der Interkalation kann keine Außenrotation von Basen erfolgen, wie es in Modell 3 verlangt ist, da die Reaktivität der Purine und Pyrimidine bei Kontamination mit Formaldehyd nicht erhöht, sondern eher erniedrigt ist. Lerman vermutete zwar eine stärkere Affinität der Acridine zu bestimmten Lücken in der DNA zwischen einzelnen Basenpaaren, konnte es jedoch nicht im Experiment nachweisen. Beers und Armilei (1965) stellten fest, daß Acridinorange und Acriflavin linear entlang der Polyribonukleotidketten angeordnet werden, und die Kapazität eines Kopolymers zur Bindung von Farbstoffen eine Funktion der Basenkomposition oder -sequenz ist. Die Acridinbindung an die DNA ist vollkommen reversibel. Lermans Ergebnisse wurden durch die Röntgenuntersuchungen des DNA-Acridin-Komplexes von Luzzati (1961) bestätigt.
Er zeigte außerdem, daß die DNA durch die Interkalation kompakter wird. Dies ist möglicherweise folgendermaßen zu erklären:

a) Die interkalierten Farbstoffmoleküle besitzen einen geringeren Radius als normale DNA.
b) Es ist möglich, daß eine Interkalation von Acridinderivaten eine Kontraktion der Phosphatradien zu den Farbstoffmolekülen hin bewirkt.
c) Es kann eine Verschiebung des Zentrums der Kreisbewe-

gungen der Helixachse näher zum Zentrum der Basenpaare erfolgen, da sich die DNA durch die Interkalation auf das Vierfache in ihrer Länge ausdehnt.

Alle diese Vermutungen sind nur mit der Interkalation und nicht mit einer äußeren Anlagerung der Acridine vereinbar.

Luzzati bestätigte auch die Resultate von Peacocke und Skerrett (1956), daß Proflavin in niedrigen Konzentrationen in einer Reaktion erster Ordnung an die DNA gebunden wird, wobei diese mit einem Acridinmolekül pro vier oder fünf Nukleotiden gesättigt wird. In höheren Konzentrationen herrscht gegenüber der monomeren Bindungsform eine assoziierte Bindung an die DNA vor, die nach einer Reaktion höherer Ordnung abläuft und zu einer 1:1 Relation der Acridine und Nukleotide führt. Während in niedrigen Konzentrationen die Interkalation der Acridine nach dem Modell von Lerman abläuft und diese Einlagerung charakteristisch für Proflavin ist (Gräslund et al. 1969), findet in höheren Konzentrationen eine exzessivere, aber schwächere äußere Bindung (stacking) an die DNA statt (Fahrig 1976). Diese zweite Form der Bindung ist nach Gräslund für Acridinorange charakteristisch.

Wenn einige Acridine in einem oder beiden homologen Chromosomen während der Rekombination interkaliert sind, tritt überall dort, wo ein Acridinmolekül in einem der beiden gepaarten Chromosomen ohne entsprechenden Acridinpartner im andern Chromosom eingelagert ist, eine Verschiebung der exakten Paarung auf der Seite des Sitzes der Interkalation auf. Wenn die Chromosomen unterhalb

des Sitzes der Interkalation gepaart werden, wird das Chromosom, welches das Acridin enthält, dasjenige Basenpaar, das mit dem nächsten Nachbarn korrespondiert, dem anderen oberhalb des Sitzes der Interkalation anbieten. Nach jedem möglichen Intervall, in dem dieselbe Anzahl von Acridinen in beiden Chromosomen interkaliert sind, stimmen die Paarungsbedingungen wiederum vollkommen überein. In diesem Intervall sind jedoch einer oder mehrere Schritte registerwidrig.
Wenn die Chromosomen nun Seite an Seite genau an der gleichen Stelle brechen und sich unter Austausch der Bruchstücke wieder verbinden, besteht das Ergebnis in dem Verlust von einem oder mehreren Basenpaaren in dem einen, und gleichzeitig in einer Duplikation von einem oder mehreren Basenpaaren in dem anderen Chromosom. Dieser Mechanismus, dessen Häufigkeit natürlich von der Frequenz des 'crossing-over' abhängig ist, führt so während der Rekombination zu Deletionen und Insertionen (Lerman 1963).

Die Theorie über den Wirkungsmechanismus der Acridine von Brenner et al. (1961) fußte zwar ebenfalls auf der Idee der Lückenbildung zwischen den Basen der DNA und der Interkalation der Acridine, jedoch vermuteten sie, im Gegensatz zu Lerman, der die Interkalation der Acridine anstelle eines Basenpaares vorschlug, eine Einlagerung der Acridine in einem einzelnen Strang der DNA. Dies erfordert natürlich ein anderes Modell als das von Lerman propagierte, um eine Paarung eines ausgezogenen, das Acridinmolekül enthaltenden Stranges und eines nicht ausgezogenen Stranges,

der kein Acridin enthält, zu ermöglichen. Sie sehen deswegen den Mechanismus der Entstehung von Insertionen und Deletionen infolge der Interkalation von Acridinen in einem einzelnen Strang der DNA während der 'Replikation' der DNA.

Findet die Einschiebung eines Acridinmoleküls in einem DNA-Strang vor der Replikation statt, so bildet sich zwischen den beiden auseinandergerückten Basen ein Zwischenraum, der in dem, während der folgenden Replikation neu entstehenden Schwesterstrang durch die Einfügung eines der vier möglichen Mononukleotide gefüllt werden kann, wie es in der folgenden Zeichnung gezeigt ist. In der folgenden Verdopplung wird dieses Mononukleotid ganz normal gepaart.

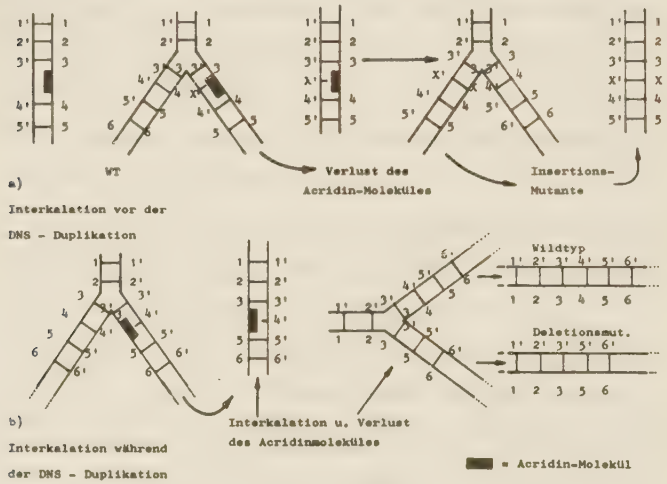


Abb.7: Postulierter Wirkungsmechanismus bei der Induktion von Insertions- und Deletionsmutanten durch Acridin. Aus: Kaudewitz, Molekular- und Mikrobengenetik, 1973.

Dadurch entsteht schließlich ein DNA-Doppelstrang, welcher an dem ursprünglichen Ort der Acridineinschiebung als Insertionsmutante ein Mononukleotidpaar zuviel aufweist. Zu einer Deletion kommt es, wenn sich das Acridinmolekül während der Replikation in den neuentstehenden Strang anstelle des einzubauenden Nukleotides setzt. Ein solcher Doppelstrang weist an der betreffenden Position einander gegenüberliegend ein Acridinmolekül und ein normales für die betreffende Position bezeichnendes Mononukleotid auf. In der folgenden Verdopplung wird das Letztere durch das Acridinmolekül markiert. Es kann nicht abgelesen werden. Im neusynthetisierten Schwesterstrang entfällt daher diese Position. Nach einer weiteren Verdopplung liegt schließlich ein DNA-Doppelstrang vor, dem ein Mononukleotidpaar fehlt. Das Ergebnis ist eine Deletionsmutante (Kaudewitz 1973).

Deletionen und Insertionen einer Base sind laut Brenner für schwerwiegende Veränderungen verantwortlich, nämlich:

a) Bruch der Polypeptidkette

b) mögliche Veränderungen der Sequenz der Aminosäuren

c) total fehlende Produktion von Proteinen.

Beweise hierfür lieferten Brenner et al.(1961) in Untersuchungen am O-Locus des T4-Phagen und h-Locus des T2L-Phagen. Beim T4-Phagen gelang es im Gegensatz zu Versuchen mit Basenanalogen nicht, O-Locus-Mutanten durch Proflavinbehandlung zu erzeugen. Am T2L-Phagen ließen sich von 6 h^+ Spontanmutanten alle mit Basenanalogen revertieren, mit Proflavin jedoch nicht eine. Diese Ergebnisse stehen im

Gegensatz zu denen von Freese, der berichtete, etwa 85% der spontanen r_{II} Mutationen könnten nicht mit Basenanalogen revertiert werden. Brenner und Barnett (unpubl.) konnten mit Proflavin am h-Locus nur eine Mutation statt 13 Mutationen, wie es rechnerisch zu erwarten gewesen wäre, induzieren. Die Erklärung für diese, gegenüber Freese konträren Ergebnisse, suchten Brenner et al. in dem Unterschied zwischen den von ihnen untersuchten O- und h-Loci und dem r-Locus. Die O- und h-Loci produzieren laut Brenner lebenswichtige Teile des Phagen, während der r-Locus wahrscheinlich keine Teile des Phagen produziert. Da von ihnen keine Mutante mit nur leicht verändertem Protein zu finden war, schlossen sie, daß Acridinmutationen eher kein als nur ein leicht verändertes Protein erzeugen.

Die von Lerman (1963) geäußerte Vorstellung, daß Acridine mit dem Prozeß der Rekombination durch Erzeugung ungleicher 'crossing-over' interferieren, steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, daß Acridine nur in Systemen mit hohen Rekombinationsraten als Mutagene wirksam sind, jedoch keine Mutationen an extrazellulären Phagen induzieren. So ist Proflavin ein starkes Mutagen bei T even Phagen, die jedoch insofern eine Besonderheit darstellen, als sie in ihrer DNA Hydroxymethylcytosin besitzen und diese HMC-Basen glucosyliert sind. Drake (1963,1964) untersuchte, ob diese Besonderheit irgendeinen Einfluß auf die Stärke der mutagenen Wirkung der Acridine ausübe.

Wenn T even Phagen in Escherichia coli-Mutanten aufwachsen, die einen Defekt in der Biosynthese der Uridin-diphospho-

glucomutase besitzen, so haben die nachfolgenden Phagen so gut wie keine glucosylierten HMC-Moleküle (Shedlovsky und Brenner 1963). Da sich bei einer anschließenden Behandlung mit Proflavin keine Erhöhung der Mutantanzahl ergab, kann man eine Einwirkung der Glucosylierung von HMC auf die Stärke der mutagenen Wirkung des Proflavin ausschließen. Drake untersuchte außerdem, ob die Induktion von Mutationen durch Proflavin von der Replikation abhängig ist, oder ob sie während der Rekombination auftritt. Der von ihm durchgeführte Versuch sei hier kurz beschrieben:
Im T4-Phagensystem kann die Replikation durch F-UdR unterbrochen werden (Cohen et al. 1958). F-UdR beeinflußt weder die Rekombinationsfrequenz der Phagen, noch die mutagene Wirkung des Proflavin. Die Phagen-DNA wird in frühen Stadien der Infektion synthetisiert (Stent und Maaløe 1953). Mit T4-Phagen infizierte Zellen werden nach einer kurzen Inkubationszeit, während der die Phagen-DNA-Synthese stattfindet, mit Chloramphenicol zur Unterbrechung der Proteinsynthese behandelt. Im Laufe der weiteren Inkubation staut sich eine Menge von Phagen-DNA in den Zellen an (Kellenberger, Sechaud und Ryter 1959). Nach Wegnahme des Chloramphenicols und Zugabe von F-UdR wird die Phagen-DNA-Synthese unterbrochen, aber vorher gebildete Genome reifen zu infektionstüchtigen Partikeln heran. Die Rekombination verläuft ungestört weiter. Wird Proflavin jetzt hinzugegeben, ergibt sich trotz der abgebrochenen Replikation ein starker mutagener Effekt. Dieser Versuch beweist, daß die mutagene Wirkung des Proflavin von der Replikation unabhängig ist.

Aber auch die Rolle der Rekombination im Sinne einer Insertions- und Deletionsentstehung, wie sie von Lerman vorgeschlagen wurde, erscheint laut Drake zweifelhaft, da hohe Konzentrationen von Acridinderivaten die Frequenz der Rekombination verringern.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Vorstellungen, daß die Acridine Insertionen und Deletionen hervorrufen, stehen die Ergebnisse von Herbold (1976). Bei der Testung der Acridine, vertreten durch Acridinorange und Trypaflavin, an den für Basenpaarsubstitutionen besonders sensiblen Stämmen Salmonella thyphimurium TA 1535 und TA 100 und den für Rasterschubmutationen empfindlichen Stämmen TA 1538 und TA 98 ergab sich, daß die Acridine im Lebermikrosomentest bei den beiden erstgenannten Stämmen in signifikanter Weise Substitutionen erzeugten. Dabei zeigten sich bei Salmonella thyphimurium TA 100, die sich aufgrund der höheren Mutantendifferenz als auch der höheren Mutationsfrequenzsteigerung als sensitiver erwies, noch eindeutigere Ergebnisse als bei TA 1535. Möglicherweise sind die Basenpaarsubstitutionen auf eine äußere Anlagerung der Acridine (stacking) an die DNA zurückzuführen, wie es von Peacocke und Skerrett bei der Verwendung höherer Konzentrationen von Acridinderivaten vorgeschlagen wurde. Mit den Bakterienstämmen TA 1538 und TA 98 konnten in den Versuchen von Herbold auch Frameshiftmutationen durch Trypaflavin induziert werden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die verwendete Konzentration der Acridine ausschlaggebend sein kann, ob sie durch den Sandwichmechanismus oder äußere Anlagerung an die DNA wirksam werden.

Die Deletion oder Insertion eines Basenpaares hat generell für das betroffene Gen und dessen Fähigkeit, ein Protein zu kodieren, eine viel größere Konsequenz als eine einfache Substitution einer Base durch eine andere, außer, wenn die Substitution zu einem 'nonsense codon' führt. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß eine Basenpaarsubstitution nur auf das eine Codon wirkt, in dem die Substitution auftritt, und normalerweise durch die Veränderung eines Tripletts zu einer Veränderung einer einzigen Aminosäure im fertigen Proteinmolekül führt. Im Falle der Entstehung eines 'nonsense codons' infolge einer Substitution wird die Proteinsynthese an der Stelle der Punktmutation gestoppt. Mit einer Insertion oder Deletion einer einzelnen Base wird das Ablesen jedes weiteren Codons hinter dem Sitz der Punktmutation verändert und ist nun inkorrekt, weil die genetische Information abgelesen wird, indem an einem Ende des Genes begonnen wird und nur in eine Richtung fortgeschritten wird. Weil der Code nicht überlappend ist, schließt das neu entstandene Codon entweder infolge einer Insertion einer Base eine andere, ursprünglich in ihm enthaltene Base aus, oder bezieht infolge einer Deletion einer Base eine andere Base des Nachbarcodons mit ein. Auf jeden Fall werden alle Codons hinter dem Sitz der Punktmutation im Sinne einer Frameshift verändert. Das Ableseraster der Tripletcodes verschiebt sich hierbei nach folgenden Möglichkeiten:

1. Verschiebung um $\pm 3n$ erzeugen keinen Rasterschub.
2. Verschiebungen mit $1 \pm 3n$ und $2 \pm 3n$ erzeugen Rasterschub. (Drake 1970).

Dies führt zu starken Veränderungen der Proteine. In der stärksten Ausprägung der Frameshift werden überhaupt keine Proteine gebildet.

Bei Doppelmutationen, hervorgerufen durch Interkalation zweier Acridinmoleküle an verschiedenen Stellen, folgt gewöhnlich einer Deletion eine Insertion und umgekehrt. Hierbei verändert sich der genetische Code und damit das Proteinprodukt nur in dem Zwischenstück zwischen den beiden Mutationen. Liegen die Mutationen sehr eng beieinander, so kann das Proteinprodukt eines Cistrons in Einzelfällen aktiv sein. Terzaghi (1966) zeigte dies am Lysozym des Pseudowildtypes im T4-Phagensystem.

Das Lysozym war in der Weise verändert, daß die Aktivität nur die Hälfte der Aktivität des Wildtyp-Lysozyms erreichte. Eine Aminosäurenanalyse des Lysozyms des Wildtypes und der Doppelmutante zeigte in der Chromatographie folgenden Unterschied: Peak 10 war nur im Wildtyp, 19 nur in der Doppelmutante vorhanden, während alle anderen 17 Peaks identisches Aminosäurenmaterial enthielten. Peak 10 und 19 enthielten jeweils nur ein Peptid der folgenden Zusammensetzung:

1	2	3	4	5	6	7	8	
Ser-	Pro-	Ser-	Leu-	Asn-	Ala-	Ala-	Lys	Wildtyp
Val-	His-	His-	Leu-	Met-	Ala-	Ala-	Lys	Doppelmutante

Das Lysozym der Doppelmutante unterschied sich von dem des Wildtypes also nur in den ersten fünf Aminosäuren. Aufgrund von Untersuchungen von Nierenberg et al. (1965) und Khorana et al. (1965) (zitiert nach Terzaghi 1966), die auf der Basis von in vitro Versuchen für jede der 20

Aminosäuren eine Karte der spezifischen Tripletts herstellten, konnte Terzaghi für die fünf veränderten Aminosäuren des Lysozyms, die in der Folgenden Abbildung gezeigte Deletion und Insertion in der DNA des T4 Phagen nach Acridinbehandlung feststellen.

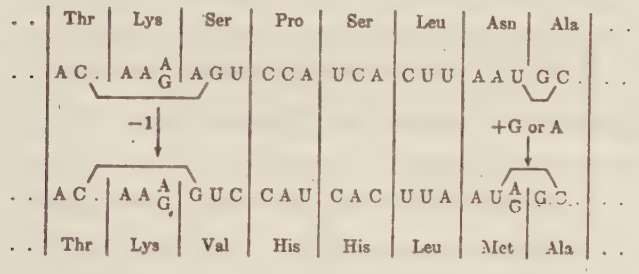


Abb. 8: Aus: Terzaghi et al., Change of a sequence of amino acids in phage T4 lysozym by acridine induced mutations, 1966.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich jedoch nicht bzw. nur unter großen Vorbehalten auf den Menschen extra polieren, da die benutzten Versuchsobjekte, welche zum größten Teil Mikroorganismen waren, sowohl morphologisch als auch in ihrem Stoffwechsel von dem des Menschen zu stark differierten. Die Experimente waren jedoch unerläßlich zur Erforschung der grundlegenden Vorgänge bei der Induktion von Genmutationen durch die Acridinderivate.

2. Chromosomenaberrationen

Über das Auftreten struktureller Chromosomenaberrationen in Pflanzenzellen nach Behandlung mit Acridinen berichteten

zum Beispiel D'Amato (1951), Nuti-Ronchi und D'Amato (1961), Michaelis und Rieger (1963) und andere Autoren.
Seit Anfang dieses Jahrhunderts ist bekannt, daß sichtbares Licht Inhibitionen und letale Effekte in lebenden Zellen zu induzieren vermag, wenn gleichzeitig Sauerstoff und eine sensibilisierende, zur Lichtabsorption fähige Substanz anwesend sind. Dieses Phänomen wurde von Kihlman (1959, 1961, 1966) "Photodynamischer Effekt" genannt. Für seine Versuche zur Induktion struktureller Chromosomenveränderungen durch sichtbares Licht an den Wurzelspitzen von Vicia faba wählte Kihlman als sensibilisierende Substanz den Farbstoff Acridinorange, der eine hohe Affinität zur Nukleinsäure hat. Kihlman erzielte an, mit Acridinorange vorbehandelten Zellen, strukturelle Chromosomenveränderungen vom Chromatidtyp, markante Effekte ließen sich jedoch erst bei 20 % iger Sauerstoffzugabe erreichen. Das Maximum der Aberrationen trat aber erst 24 - 48 Stunden nach der Behandlung auf. In diesen Versuchen ließ sich der Sauerstoff durch Phenylinitrosamin oder Stickstoffmonoxyd ersetzen. Außerdem konnte nur solches Licht verwendet werden, welches mit seiner Wellenlänge dem Absorptionsspektrum des Acridinorange entsprach.
Der biologische Effekt beruht wahrscheinlich auf einer photosensitiven Oxydation von organischem Material, wodurch organische Peroxide gebildet werden. Über organische Peroxide als Verursacher chromosomaler Aberrationen in den Wurzelspitzen von Bohnen berichteten sowohl Kihlman als auch Loveless (1951). Schenck (1955, 1957; zitiert nach

Kihlman, 1959) berichtet über die in vitro Synthese einer Reihe organischer Peroxide, die durch Licht bei Anwesenheit von Sauerstoff und einer sensibilisierenden Substanz induziert wurden.

Neben der Möglichkeit der Chromosomen- und Chromatidenaberrationen durch direkten physikalischen oder chemischen Angriff des Chromosomenmateriales infolge Röntgenbestrahlung, UV - Bestrahlung, Virusinfektionen und eine Vielzahl chemischer Komponenten, führten Beobachtungen von Allison und Paton (1965) zu der Annahme, daß eine Spaltung der Chromosomen durch aktivierte hydrolytische Enzyme erfolgen könnte, wie zum Beispiel durch die, aus den Lysosomen freigesetzte Desoxyribonuklease.
Mit Hilfe der Eigenschaft der Zellen, Farbstoffe in den Lysosomen selektiv zu konzentrieren, und der Möglichkeit, die Membranen der Farbstoffe enthaltenden Lysosomen durch, infolge Lichtexposition entstandener, photooxidativer Veränderungen zerstören zu können (Methode der selektiven Aktivierung lysosomaler Enzyme), gelang es ihnen, an menschlichen Lungenzellen mit Acridin einen Anstieg der Chromosomenbrüche zu erreichen. Ohne gleichzeitige Bestrahlung und Sauerstoffzufuhr waren keine Brüche induzierbar.
Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Kihlman (1959) und Dubinin et al. (1961) überein, die unter den gleichen Bedingungen Phaseolus und Allium cepa - Wurzelspitzen mit Acridinorange, Rivanol, Methylenblau und Toluidinblau behandelten. Während die beiden Acridinderivate direkt im

Kern wiederzufinden waren, so daß man hier eine direkte Einwirkung der Acridinderivate auf die DNA sah, ließen sich die beiden letztgenannten Farbstoffe nach Untersuchungen von Rapoport sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen nur in den Lysosomen nachweisen. Die intrazelluläre Verteilung des Farbstoffes Acridin wurde von Allison und Paton durch direkte und fluoreszierende Mikroskopie untersucht und ebenfalls nur in den Lysosomen gefunden.

Der Wirkungsmechanismus von Acridin wurde von Allison und Paton in der Freisetzung lysosomaler Desoxyribonuklease gesehen, die die Chromosomen anzugreifen vermag. Die Desoxyribonuklease besitzt außerdem die bemerkenswerte Eigenschaft, beide Stränge der DNA-Doppelhelix gleichzeitig brechen zu können, wodurch deren Reparatur erheblich erschwert wird. Bei Zugabe von Desoxyribonuklease zu isoliertem Kernmaterial nahm die Aktivität der DNA abhängigen RNA - Polymerase ab, was dafür spricht, daß die Desoxyribonuklease in den Kern einzudringen vermag. Eine Kernschädigung durch Radikale, welche durch Photonenabsorption in den Lysosomen entstehen und in den Kern gelangen könnten, schien in diesem Experiment nicht möglich, weil die Lebenszeit der Radikale in Gegenwart von Proteinen oder anderen reaktiven Gruppen zu gering, und die Konzentration der Radikale infolge der geringen Konzentration der verwendeten photosensiblen Substanzen minimal waren.

Buchinger (1969) untersuchte die Wirkungen von Trypaflavin alleine und in Kombination mit sichtbarem Licht auf die

Chromosomen von HeLa-Zellen und menschlichen Leukozyten. Alle Zellen werden 24 Stunden lang mit einer Trypaflavinlösung behandelt, und einige Zellkulturen zusätzlich eine Stunde lang dem Licht einer 300 Watt Glühbirne exponiert. Hieraus ergaben sich, wie aus den folgenden Zeichnungen zu ersehen ist, zwischen den mit oder ohne Lichtexposition behandelten Zellen interessante Unterschiede.

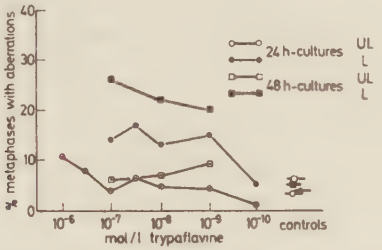


Abb. 9: Dosis-Effekt-Beziehung von mit Trypaflavin behandelten HeLa-Zellen; UL nicht belichtet, L belichtet

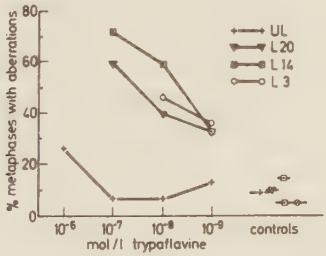


Abb. 10:Dosis-Effekt-Beziehung von mit Trypaflavin behandelten Lymphozyten;UL nicht belichtet;L 20,L 14,L 3 eine Stunde lang Belichtung 20,14 bzw. 3 Stunden vor Aufarbeitung.

Abb.9 und 10:Aus: Buchinger, Die Wirkung von Trypaflavin allein und in Kombination mit sichtbarem Licht auf die Chromosomen von HeLa-Zellen und menschlichen Leukozyten, 1969.

In beiden Systemen erwiesen sich Konzentrationen der Trypaflavinlösung von 10^{-5} mol/l und größer als letal für alle Zellen. Ein signifikanter Anstieg der Chromosomenaberrationen in den mit Licht exponierten Systemen konnte schon mit Konzentration von 10^{-7} mol/l bis 10^{-9} mol/l erzielt werden, während in den nicht mit Licht behandelte Systemen Konzentrationen von 10^{-6} mol/l notwendig waren. Diese Konzentration von 10^{-6} mol/ l führte in beiden Zellsystemen zu einer starken Hemmung der Mitosenrate. Unter Lichteinfluß verstärkte sich diese Wirkung erheblich, so daß mit einer Reduzierung der Trypaflavinkonzentration um eine Zehnerpotenz nur 10^{-7} mol/l etwa diegleichen Ergebnisse erzielt wurden. Es löste fast nur in den die Mitosenrate senkenden Konzentrationen eine Erhöhung der Zahl der strukturellen Chromosomenaberrationen aus. Die Konzentrationen, die die Mitosenrate nicht verringern, erzeugen praktisch nur noch achromatische Läsionen, jedoch keine Brüche mehr. Ein paralleler Anstieg von Brüchen und Translokationen ist bei den belichteten Zellkulturen erkennbar. Die meisten Brüche sind vom Chromatid- oder Isochromatidtyp. Im Vergleich mit der Wirksamkeit des Trypaflavin auf die Geschlechtszellen der Maus werden mutagene Veränderungen an menschlichen Zellkulturen durch wesentlich geringere Dosen hervorgerufen. Bei in vitro Versuchen erwiesen sich bereits Konzentrationen von 260 µg/l als wirksam.

III. Eigene Untersuchungen

1. Problemstellung

Baldermann (1967) und Brucklacher (1969) untersuchten verschiedene Stadien der Spermatogenese bzw. Oogenese der Maus nach einer Behandlung mit Trypaflavin, die oral oder intraperitoneal, akut oder chronisch mit verschieden hohen Dosen durchgeführt wurde. Sie bedienten sich dabei des dominanten Letaltestes. In ihren Untersuchungen (siehe ausführlichere Darstellung in Kapitel III, 4.1 und III, 4.2 erwies sich das Acridinderivat Trypaflavin unter gewissen Bedingungen als schwach wirkendes Mutagen.

Das Prinzip des dominanten Letaltestes beruht auf einer Behandlung weiblicher oder männlicher Tiere zu verschiedenen Zeitintervallen vor der Verpaarung. Am 15. Tag post conceptionem werden die weiblichen Tiere abgetötet und die Uteri seziert. Die durch die Behandlung mit dem mutagenen Agens induzierten Gen-, Genom- und Chromosomenmutationen können zum Absterben von prä- und postimplantativen Embryonen führen. Derartige Veränderungen des genetischen Materials faßt man unter dem Begriff "dominante Letalfaktoren" zusammen. Sie äußern sich bei der Maus

a) durch eine Verminderung der Implantate im graviden Uterus im Verhältnis zur Anzahl der Corpora lutea graviditatis im Ovar (präimplantative Eiverluste). Ein Anstieg der präimplantativen Eiverluste kann als Hinweis auf eine Induktion dominanter Letalmutationen durch eine chemische Substanz gewertet werden.

b) durch ein vermehrtes Auftreten von 'Deziduomata' als Ausdruck von Feten, die etwa zum Zeitpunkt der Implantation abstarben, oder von 'Spätstadien', das heißt, von im Laufe der frühen Embryonalentwicklung abgestorbenen Feten. Diese beiden Effekte faßt man als postimplantative Eiverluste zusammen und benutzt sie im dominanten Letaltest als Hauptindiz für mutative Veränderungen durch chemische Mutagene.

Die Bewertung der Ergebnisse des dominanten Letaltestes ist problematisch. Insbesondere die Rate der präimplantativen Eiverluste und das Absterben der frühen Implantate können durch zahlreiche exogene Einflüsse bedingt sein, wie Temperaturschwankungen, jahreszeitliche Einwirkungen, Infekte usw. (Röhrborn 1968). Außerdem können präimplantative Eiverluste nach einer Behandlung männlicher Tiere nicht nur durch dominante Letalfaktoren induziert sein, sondern auch durch toxische Effekte der Behandlung, die sich in Aspermie, welche das Entstehen einer Zygote verhindern würde, Oligospermie und Inaktivierung des Spermas äußern können (Röhrborn 1968). Aber auch vollkommen normal befruchtete Eier können wegen einer hormonellen Fehlstimulation des Uterusgewebes nach Behandlung von weiblichen Tieren einmal nicht zur Implantation gelangen (Bateman 1958 a,b). Außerdem können unbefruchtete Eier schon in den oberen Abschnitten des Eileiters zugrunde gehen. Selbst Schädigungen des Eiplasmas, des Uterus und der Adnexe können sich in einer Erhöhung der präimplantativen Eiverluste auswirken.

Würde man die Rate der präimplantativen Eiverluste jedoch außer Acht lassen, könnte man, da sich insbesondere stark wirkende Mutagene in einer Steigerung der präimplantativen Eiverluste äußern, die Stärke der mutagenen Wirkung derartiger Substanzen unterschätzen. Man sollte deshalb eine Erhöhung der präimplantativen Eiverluste nur als Hinweis auf eine mutagene Wirkung bewerten (Röhrborn 1970).
Auch die Rate der postimplantativen Eiverluste könnte durch Endometriumläsionen u.ä. verändert werden, ohne daß dominante Letalfaktoren dafür verantwortlich sein müssen.
Die Methode des dominanten Letaltestes erfaßt sicherlich nur einen Teil der genetischen Defekte. Nicht jede Veränderung des genetischen Materials muß zum Absterben der Zygote führen. Das Auftreten von dominanten Letalmutationen kann auf verschiedene genetische Defekte zurückzuführen sein, deren Differenzierung im dominanten Letaltest nicht möglich ist. Embryonen, die kurz vor oder nach der Implantation als Folge mehrerer dominanter Letalmutationen abstarben, führen in der Auswertung des dominanten Letaltestes zu einer geringeren Zahl von Eiverlusten als es dem Vorkommen genetischer Defekte entspricht. Dies gilt nicht für schwache Mutagene, wie das in dieser Arbeit verwendete Trypaflavin. Aber besonders bei der Untersuchung starker Mutagene und hinsichtlich der Möglichkeit, eine Dosis/Effekt-Beziehung aufzustellen, ist dies höchst problematisch.
Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, die Befunde des dominanten Letaltestes durch cytogenetische Untersuchungen

zu spezifizieren.

So war es die Aufgabe dieser Arbeit, die Chromosomen der M II-Oocyten adulter Mäuse zu analysieren, die chronisch mit Trypaflavin auf oralem Wege behandelt worden waren, um möglicherweise darüber Aufklärung zu bekommen, ob das Auftreten von Eiverlusten im dominanten Letaltest in den Untersuchungen Brucklachers tatsächlich auf dominante Letalmutationen zurückzuführen ist, oder ob andere Faktoren hierfür verantwortlich zu machen sind.

2. Material und Methode

2.1. Ablauf der Oogenese

Die mutagene Wirkung chemischer Agentien ist weitgehend von den cytologischen und biochemischen Vorgängen in den Geschlechtszellen während der Behandlung mit dem Mutagen abhängig. Die Wirkung von Testsubstanzen kann dabei ausgesprochen stadienspezifisch sein. Für eine exakte Planung und Durchführung von Mutagenitätsuntersuchungen ist eine Berücksichtigung der Stadienabläufe der Entwicklung der weiblichen oder männlichen Geschlechtszellen unabdingbar.

Die Oogenese der Maus läßt sich in ihrem Ablauf in drei große Abschnitte unterteilen:

a. Prädictyotän

Die Oogonien entstammen dem Dottersackepithel des Eies, wo die primordialen Geschlechtszellen aufgrund ihres hohen Gehaltes an alkalischer Phosphatase schon beim 8 Tage alten Mäuseembryo identifiziert werden können. Die Gonaden sind schon ab dem 10. Tag im Embryo erkennbar (Borum 1961). Bis zum 12. Tag haben die primordialen Geschlechtszellen ihre Wanderung in die Gonaden abgeschlossen (Mintz 1960). Hier wandeln sie sich in die sex-chromatin negativen Oogonien um (Ohno et al. 1964), und diese vermehren sich durch wiederholte Mitosen. Am 13.,14. und 15. Tag des Fetallebens erfolgt die letzte reguläre DNA-Synthese während des gesamten Ablaufes der Oogenese. Die Oogonien treten sofort anschließend ins

Leptotän der Meiose ein (Peters und Levey 1962). Hierbei wandeln sich die Oogonien zu Oocyten um.
Im Zygotän findet die Paarung der Chromosomen und eine Replikation eines geringen Teiles der DNA statt, die sich in der prämeiotischen S-Phase nicht verdoppelte. Störungen im normalen Ablauf der Meiose während des späten Zygotäns und frühen Pachytäns führt zum Auftreten von achiasmatischen Zellen. Im frühen Pachytän findet das crossing-over statt.

b. Dictyotän

Vom 1. bis 5. Tag nach der Geburt werden alle Oocyten, die nicht degeneriert sind, von Follikelzellen umgeben, so daß sie Primordialfollikel bilden. Sie befinden sich jetzt in einem der Interphase ähnlichen Stadium, dem Diplotän. Während die Chromosomen im frühen Diplotän noch gut sichtbar sind, gehen sie später in den gestreckten Zustand über, und sind so, im Gegensatz zu den Chromosomen beim Menschen, selbst elektronenmikroskopisch unsichtbar (Tsuda 1965).

c. Präovulatorische Oocytenreifung

Der große Nukleolus löst sich auf, das vorher nahezu unsichtbare chromatische Material kondensiert sich, und die Bivalente werden in der Chromatinmasse sichtbar. Die Spindel wird gebildet. Diese Stadien können zur Prometa - phase I zusammengefaßt werden. In der Anaphase I werden die Bivalente getrennt und auf die Spindelpole verteilt. In der Telophase I ist der erste Polkörper ausgebildet. Das Ergebnis der ersten Reifeteilung ist die Reduktion

Abb.11: Darstellung der zeitlichen Abläufe cytologischer und biochemischer Vorgänge in der Oogenese der Maus

PRIMORDIAL GERM CELLS in yolksack epithelium sex-chrom.-pos.	migration to gonads	8. day p.c. 9.—12.
	multiplication by repeated mitosis	
OOGONIA in cortex of gonads sex-chrom.-neg.; DNA-synth.		day post coitum ± 1 day
OOCYTES (Meiocytes)		
INTERPHASE, DNA-repl.-synth. (99.7%)		14.
LEPTOTENE		
ZYGOTENE, pairing, synaptin. compl. (DNA-repl.-synth. 0.3%)		14.—15.
PACHYTENE, crossover (DNA-repair-synth.)		16.—18.
DIPLOTENE, chiasmata, DNA-?-synth.		19.
DICTYOTENE/LAMPBRUSH RRNA-a.m-RNA-synth. during follicle-maturation	forming of primordial foll.	1.—5. day post partum until antr. formation.
		Hour of day during oest. ± 2 h
PROMETAPHASE I		19—22 h
CHROMATIN MASS TRANSITIONAL PHASE FORMING SPINDLE	"earliest readiness to mate"	20 h
METAPHASE I, terminalization of chiasmata		22—1 h
ANAPHASE I, sep. of bivalents into univ.		1 h
TELOPHASE I, 1. polar body		2 h
PROMETAPHASE II		3 h
METAPHASE II	ovulation	4 h
ZYGOTE	sperm penetration	9 h
ANAPHASE II		9 h
TELOPHASE II, 2. polarbody		
PRONUCLEI postmeiot. DNA-repl.-synth.		
MITOSIS I		24 h

Aus: Kuhlmann, W., Cytology and Timing of Meiotic Stages in Femal Germ Cells in Mammals and Man. In: Vogel, F. und Röhrborn, G., Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 460-502, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970.

des diploiden Chromosomensatzes der primären Oocyte zum haploiden Chromosomensatz der sekundären Oocyte, der aus 20 Chromosomen besteht.
Die erste Reifeteilung ist kurz vor der Ovulation abgeschlossen, und sie umfaßt den Zeitraum vom 14. Tag post conceptionem bis etwa zur Ovulation. Der größte Anteil an diesem Zeitraum entfällt dabei auf das Dictyotän.
Nachdem die erste Reifeteilung abgeschlossen wurde, tritt die Oocyte ohne Zwischenschaltung einer Interphase sofort in die zweite Reifeteilung ein. Zum Zeitpunkt der Ovulation befinden sich die Oocytenchromosomen im Stadium der Metaphase II. Die Anaphase II beginnt nach der Penetration des Spermiums. In der Telophase II ist der zweite Polkörper gebildet.
Die Ovulation und die Vollendung der zweiten Reifeteilung mit der Trennung der Chromatiden wird auch als Postdictyotän zusammengefaßt (aus Kuhlmann 1970).

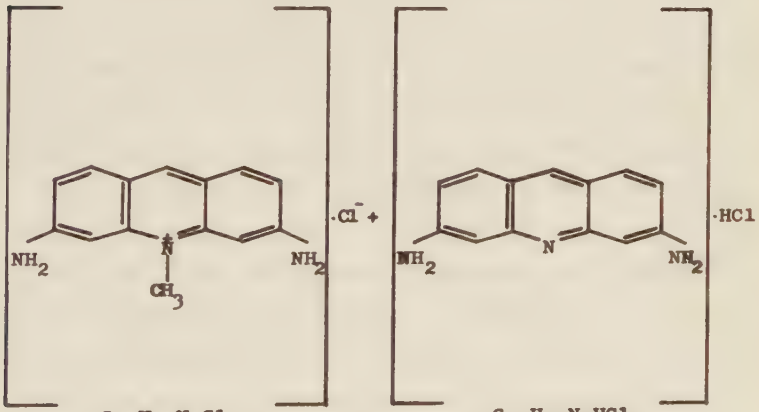
Nachdem der männliche und weibliche Pronukleus gebildet sind, und die zwei haploiden Chromosomensätze miteinander verschmolzen sind während der ersten Furchungsteilung, ist die Befruchtung vollendet.

2.2. Testsubstanz

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde als Testsubstanz das zu der Klasse der Acridine gehörende Trypaflavin verwendet. Für Trypaflavin wird in

der Literatur häufig das Synonym Acriflavin oder auch Euflavin benutzt. Während aber Acriflavin eine Mischung der sauren Hydrochloride von Proflavin (3,6 - Diaminoacridin) und Proflavin-10-methylchlorid im Verhältnis 2:1 darstellt (Hauschild 1973), besteht Trypaflavin oder 'Euflavin' aus einem Gemisch von 75 % - 80 % 3,6 - Diamino - 10 - methylacridiniumchlorid und 20 % - 25 % Diaminoacridin - monohydrochlorid in neutraler Form (Albert 1951).

Abb. 12: Struktur des Trypaflavin



$C_{14}H_{14}N_3Cl$ Molgewicht 259,73

$C_{13}H_{11}N_3HCl$ Molgewicht 245,71

Acriflavin und Trypaflavin ('Euflavin') gehören zu der Gruppe der Acridine, die eine quaternäre Komponente hinsichtlich des Stickstoffatomes im mittleren Ring des Grundkörpers besitzen. Sie zeichnen sich durch einen hohen Schmelzpunkt und eine leichte Kristallisationsfähigkeit aus.

Allgemein gelten die quaternären Acridinderivate als schlecht löslich in Wasser. Wässrige Lösungen von Trypaflavin und Acriflavin werden durch Sonnenlicht rasch zerstört. Nach 8-stündiger Exposition mit Tageslicht treten als Zeichen der Zersetzung der Acridinlösung feine, bräunliche Ausfällungen am Boden der Gefäße auf. Die Zersetzung des Acriflavins wird von Mathur und Bhatnagar (zitiert nach Albert 1951) als eine Photooxidationsreaktion beschrieben, deren Auftreten von der Anwesenheit von Luftsauerstoff abhängig ist.

Die quaternären Acridinderivate werden industriell durch Alkylierungsreaktionen (oder Arylierungen) der korrespondierenden tertiären Basen unter fünf-minütiger Erhitzung mit Methyl - p - toluensulfonat in Nitrobenzin bei einer Temperatur von 150° C oder durch eine Reduktion der N - alkylierten bzw. arylierten Acridone erzeugt (Albert, A. 1966).

Ab 1917 wurden die quaternären Acridine verstärkt zur Behandlung lokaler bakterieller Infektionen eingesetzt. Die Nachteile des Acriflavin in der Therapie derartiger Erkrankungen wurden jedoch bald erkannt. Weil es

1. einen niedrigen pH-Wert besitzt,
2. hochtoxisch gegen feines Gewebe ist,
3. verunstaltende Farbflecke verursacht und
4. aus einer variablen Mischung seiner Bestandteile besteht, deren Reinheitsgrad nicht genau bestimmt werden kann,

- aus all diesen Gründen wurde seine Anwendung zu Gunsten des Trypaflavin mit dessen geringeren unerwünschten Neben-

wirkungen zurückgedrängt. Das im Trypaflavin enthaltene Proflavin tritt in zwei wasserunlöslichen Formen, nämlich als freie Base und als Oleat, und in einer wasserlöslichen Form, als neutrales und als saures Sulfat, auf. Die Letzte wird in der klinischen Therapie bevorzugt, da Proflavin als freie Base aufgrund seiner hohen Basenstärke alkalische Nekrosen hervorruft und sich als Oleat bei Wundverbänden als nicht sehr vorteilhaft erwies, in dieser Form jedoch in der Radiumtherapie der Nasennebenhöhlentumoren einen festen Platz einnimmt (Charteris 1937; Selbie und McIntosh 1943; zitiert nach Albert 1951).
Trypaflavin findet in der, in der Einleitung bereits aufgeführten Form als Rachen- und Hautdesinfiziens in der heutigen Therapie Anwendung. Mit einigen dieser Medikamente kann eine tägliche Aufnahme von Trypaflavin auf oralem Wege in Konzentrationen von 60 - 100 mg sehr schnell erreicht werden. Insbesondere bei der medikamentösen Therapie leichter Erkältungskrankheiten mit Trypaflavin enthaltenden Tabletten durch die Patienten selbst sind die aufgenommenen Dosen völlig unkontrollierbar.

2.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere für die durchgeführten Experimente dienten 5 - 12 Wochen alte weibliche Mäuse eines NMRI - Stammes. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von etwa 22° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % - 70 % in einem Laboratorium unter den Lichtbedingungen eines natürlichen Tag- und Nachtrhythmus gehalten.
Die Mäuse wurden ab ihrer fünften Lebenswoche wöchentlich

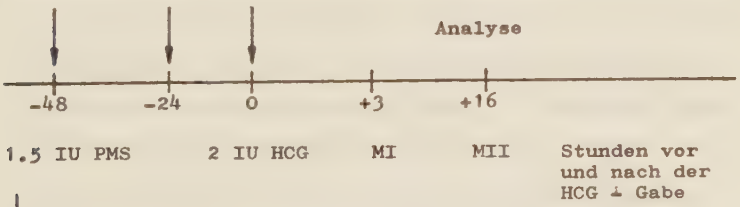
auf einer elektronischen Tischwaage gewogen. Um die Kapazität der täglichen Aufarbeitung von maximal drei Tieren voll auszuschöpfen, wurden die Mäuse unter dem Gesichtspunkt der Gewichtsgleichheit zu je drei Tieren in Gemeinschaftskäfigen, oder, wenn sich ihr Gewicht um mehr als ±0,1 g unterschied, in Einzelkäfigen untergebracht. Insgesamt wurden für die Durchführung der Experimente 95 Kontrolltiere und 105 Versuchstiere benötigt.

2.4. Applikation der Testsubstanz

Das in Pulverform vorliegende Trypaflavin wurde in einer wässrigen Standardlösung angesetzt und unter Lichtabschluß bei +2 °C aufbewahrt. Nach jeweils 48 Stunden wurde die Lösung erneuert, da sich nach etwa 55 Stunden in der grüngelblich fluoreszierenden Lösung bräunliche Auskristallisierungen am Boden des Gefäßes fanden. Derartige Lösungen erwiesen sich für die exakte Versuchsdurchführung als unbrauchbar, da sie nicht mehr die ursprünglich eingewogene Menge von Trypaflavin in gelöster Form enthielten.
Da es die Aufgabe dieser Arbeit war, festzustellen, ob Trypaflavin einen mutagenen Effekt auf die Oocyten der Maus ausübt, wenn es bis zu einer Gesamtdosis von 100 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht der Mäuse chronisch in oraler Form appliziert wird, erhielten die Mäuse täglich eine Dosis von 2,0 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht über eine Zeit von 50 Tagen auf oralem Wege mittels einer gekrümmten Knopfsonde. Die Kontrolltiere wurden in derselben Weise mit Leitungswasser sondiert. Durch sorgfältige Sondierung ließ es sich erreichen, daß von den 200 angesetzten Tieren nur

4 Tiere durch Anstechen der Carotiden innerhalb von Sekunden verbluteten. Durch genaues Abwiegen der Tiere und exakte Herstellung der Standardlösung, sowie sorgfältige Applikation wurde angestrebt, die Schwankungsbreite der gegebenen Gesamtdosis auf weniger als $\pm$ 1,5 mg um die zu applizierende Dosis von 100 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht einzuschränken.

Zwei Tage, bevor die Mäuse die notwendige Gesamtdosis aufgenommen hatten, wurde ihnen 1,5 IU PMS (pregnant mares' serum) intraperitoneal injiziert. Das Serumgonadotropin wird aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen und hat eine Wirkung, die der des follikelstimulierenden Hormones des Hypophysenvorderlappens (FSH) entspricht. Beim weiblichen Tier bewirkt es die Bildung der Follikel im Eierstock und ist an der Auslösung der Paarungsbereitschaft beteiligt. Am letzten Applikationstag , 48 Stunden nach der PMS Injektion, erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 2 IU HCG (human chorionic gonadotropin), welches aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen wird. Es stimmt in seiner Wirkung mit ICSH (interstitiel cell stimulating hormon) überein. Bei der Frau fördert es die Ovulation, die Bil - dung des Corpus luteum und dessen Progesteronsynthese.



2.5. Präparation

Die Oocyten befinden sich entsprechend der obigen Zeichnung genau 16 Stunden nach der intraperitonealen Injektion von 2 IE HCG in der Metaphase II. Zu diesem Zeitpunkt wurden die 12 Wochen alten Mäuse getötet und nach der Methode von Röhrborn und Hansmann (1971) folgendermaßen präpariert.

1. Aus der eröffneten Bauchhöhle wurden die Eileiter herauspräpariert und in ein Blockschälchen mit etwa 37° C warmer Hank's - Lösung übertragen.
2. Die folgenden Arbeiten wurden unter einer Binokularlupe mit 23facher Vergrößerung durchgeführt. In den meisten Fällen weisen die Eileiter in ihrem ovarnahen Teil eine aufgetriebene, infolge der dünnen Wandung leicht durchsichtige Stelle auf, die Ampulle. Mit einer spitzen Präpariernadel schlitzt man die Wandung der Ampulle auf und drückt den sich in ihr befindlichen "Eiballen" mit den Oocyten heraus.
3. Die Oocyten, die noch von der Corona radiata umgeben sind und durch Zwischengewebe zu einem Ballen verbunden sind, werden mit einer Pinzette in eine Kinetinlösung übertragen. Kinetin ist ein aus Stierhoden gewonnenes hochgereinigtes Hyaluronidasepräparat, das in ungelöstem Zustand fast unbegrenzt haltbar ist, in gelöster Form allmählich an Aktivität verliert, bei PH Werten über 7,5 und unter 4 sowie Temperaturen über 50° C inaktiviert wird. Jod und Formaldehyd senken ebenso ihre Aktivität. Das Ferment Hyaluronidase lockert die umge-

bende Substanz mesenchymaler Gewebe, zB. Binde- und Stützgewebe, auf (Begleitzettel der Schering AG., Berlin). Die Lösung besteht aus 150 IU Hyaluronidase (1 IU entspricht der Wirkung von 0,1 mg der 1. internationalen Standartsubstanz) und 1 ml Ringer'scher Lösung. Nach 30 Minuten hat das Ferment das Zwischengewebe und die Corona radiata aufgelöst.

4. Anschließend werden die Oocyten zur hypotonen Behandlung in ein Blockschälchen mit 1,5 % Natriumcitratlösung übertragen, worin sie 60 Minuten lang bei Kühlschranktemperatur verbleiben. Die Übertragung der Oocyten erfolgt mit einer über dem Bunsenbrenner haarfein ausgezogenen Glaspipette (Durchmesser des Hohlkanales etwa 200 μ). Am oberen Ende der Pipette befindet sich ein kleiner Gummiball, mit dem man die winzigen Sog- und Druckkräfte, die zum Ansaugen und Anstoßen der Oocyten aus der Glaspipette notwendig sind, manuell regulieren kann. Beim Ansaugen der Oocyten ist darauf zu achten, daß vor der ersten und nach der letzten Oocyte eine geringe Menge Flüssigkeit mit aufgesogen wird. Der Abstand zwischen den einzelnen Eizellen sollte so gering wie möglich sein, um zu vermeiden, daß die Oocyten in den ausgebuchteten Teil der Glaspipette gelangen, wo sie an der Glaswand haften bleiben und nicht mehr ausgestoßen werden können. Beim Ausstoßen der Flüssigkeitssäule in die hypotone Lösung sollte keine Luft mit ausgedrückt werden, die die Eizellen im gesamten Blockschälchen verteilt und das Auffinden unnötig erschwert. Dies wird durch die beim

Ansaugen vor der ersten Oocyte aufgesogene Flüssigkeit erleichter.

5. Die Oocyten werden einzeln mit wenig hypotoner Lösung aufgesogen und auf einen absolut fettfreien, im Kühlschrank in destilliertem Wasser gekühlten Objektträger übertragen. Der Natriumcitrattropfen wird sofort bis auf einen geringen Rest, in dem die Oocyte liegt, mit derselben Pipette abgesogen. Die Eizelle wird mit einem Diamantschreiber markiert und sofort mit einem, in einer weiteren Pipette befindlichen Fixativ (Gemisch von Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1) in schneller Tropfenfolge betropft. Eine schnelle Arbeitsweise verhindert ein vorzeitiges Austrocknen der Oocyte. Eine Auflösung der Oocytenmembran ist dann eingetreten, wenn die Oocyte nicht mehr aus dem Flüssigkeitsfilm des Fixativs auftaucht und der dabei entstehende typische doppelt konturierte Lichtring um die Eizelle verschwunden ist. Anschließend werden die Objektträger an der Luft getrocknet.

   Bei diesem Arbeitsschritt sind folgende Fehlermöglichkeiten zu vermeiden: 1. Bei nicht absolut fettfreien Objektträgern schwimmt der aufgetropfte Natriumcitrat - tropfen mit der Oocyte aus dem Gesichtsfeld der Stereolupe und ist nur noch selten wiederzufinden. 2. Nach dem La Place'schen Gesetz hängt die Größe der Fixativtropfen vom äußeren Durchmesser der Glaspipette ab. Es ist sinnvoll, nur dünnwandige Pipetten zu benutzen, da zu große Fixativtropfen kurz vor der endgültigen Auflösung der

Oocytenmembran bereits freiliegende Chromosomen unnötig weit versprengen und sowohl das Auffinden als auch die Auswertung der Chromosomen unter dem Mikroskop erschweren.

6. Frühestens nach 60 Minuten können die Präparate mit 2 %-iger Orceinlösung angefärbt werden. Der Färbevorgang dauert 20 - 60 Minuten. Nachdem die gefärbten Präparate eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % - 100 % Äthanol) und ein 30 minütiges Xylolbad durchlaufen haben, deckt man die Objektträger mit Eukitt ein.

2.6. Auswertung.

Nach der Kodierung der Präparate erfolgt die Auswertung und photographische Darstellung der Chromosomen mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes bei 1000-facher Vergrößerung. Die Auswertung erstreckte sich auf folgende Aberrationstypen:

A) Numerische Aberrationen

1. Polyploide Metaphasen (z.B. 4n)

   Eine Metaphase wird dann als polyploid gewertet, wenn alle Chromosomen den gleichen Kontraktionszustand aufweisen. Ein unterschiedlicher Kontraktionszustand spricht für eine Überlagerung zweier Metaphasenplatten.

2. Aneuploide Metaphasen (z.B. 20 ± 2)

   Um durch Präparationsfehler bedingte Artefakte weitgehend auszuschließen, wurden nur Metaphasen als aneuploid gezählt, die 20 ± 1 bzw. 20 ± 2 Chromosomen aufwiesen.

B) Strukturelle Aberrationen

1. Chromatidengap (G') und Isochromatidengap (G'')

   Def.: Färberische Lücke in einer bzw. beiden Chromatiden.

2. Chromatidenbruch (B') und Chromosomenbruch (B'')

   Def.: Unterbrechung der Kontinuität der Chromatiden-, Chromosomenstruktur mit achsengerechter oder achsenverschobener Dislokation des Bruchstückes.

3. Chromatidendeletion (D')

   Def.: Intercalarer oder terminaler Substanzverlust auf Chromatidenebene.

4. Chromatidenfragment (F') und Chromosomenfragment (F'')

   Def.: Azentrisches Chromatiden- oder Chromosomensegment.

5. Exchange

   a) Intrachange

      Def.: Veränderungen innerhalb eines Chromosomes (z.B. Ringchromosomenbildung)

   b) Interchange

      Def.: Veränderungen zwischen mehreren Chromosomen auf Chromatidenebene (I')
      Veränderungen zwischen mehreren Chromosomen auf Chromosomenebene (I'')

6. Multiple Aberrationen

   Def.: Es sind mehr als 5 Aberrationen pro Zelle vorhanden.

7. Pulverisation

   Def.: Das Chromatin liegt in pulverisierter Form vor typische Chromatiden- und Chromosomenstruktur

sind aufgehoben.

Zur statistischen Sicherung der Befunde wurde der χ^2-Test und der Zeichentest herangezogen (Pfanzagel 1974). Da sich das in dieser Arbeit verwendete Trypaflavin in den Untersuchungen Brucklachers schon als mutagen erwiesen hatte, brauchte im χ^2-Test nicht die sogenannte Nullhypothese zur statistischen Absicherung der Ergebnisse zugrundegelegt werden, sondern der χ^2-Test wurde einseitig angewendet. Im χ^2-Test galten P-Werte von $<0{,}01$ als signifikant.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Anteil auswertbarer Oocyten

5 Wochen alte ♀♀ NMRI Mäuse wurden 50 Tage lang mittels oraler Schlundsondierung mit 2 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht/Tag behandelt. Die Kontrolltiere erhielten in der gleichen Weise normales Wasser.

Nach der Methode von Röhrborn und Hansmann (1971) wurden 94 Kontrolltiere und 102 Versuchstiere präpariert. Da nur solche Tiere ausgewertet werden konnten, die eine oder mehr gut mikroskopisch analysierbare M II enthielten, konnten in der Kontrolle 84 Tiere und in der Versuchsgruppe 93 Mäuse verwertet werden.

Aus den Ampullen der Tiere wurden 1663 bzw. 1453 Oocyten freipräpariert. Davon konnten 1281 bzw. 1246 Oocyten auf Objektträger übertragen und fixiert werden. Diese Diskrepanz erklärt sich daraus, daß die Zahl der Oocyten pro Tier zwischen 2 - 3 und maximal 60 schwankte, und aus zeitlichen Gründen nicht mehr als maximal 20 Eizellen pro Tier übertragen werden konnten. Von den übertragenen Oocyten konnten 422 in der Kontrolle und 407 im Versuch einwandfrei mikroskopisch ausgewertet und photographisch dokumentiert werden.

Der Prozentsatz, den die ausgewerteten Oocyten an den übertragenen Eizellen einnehmen, beträgt sowohl in der Kontrolle als auch im Versuch etwa 33 %. Hieraus kann man folgern, daß präparatorisch bedingte grobe Fehlerursachen, die zu ungleichen Voraussetzungen der Basis für

die statistische Auswertung der Ergebnisse führen würden, weitgehend ausgeschlossen werden können.

Tabelle 3: Anteil auswertbarer Oocyten

Serie	Tiere	auswertbare Tiere mit 1 oder mehr auswertbaren MII	freipräparierte Oocyten	fixierte Oocyten	auswertbare Oocyten	% auswertbarer Oocyten an fixierten Oocyten
Kontr.	94	85	1663	1281	422	32,9
Versuch	102	93	1453	1246	407	32,6

3.2. Ergebnisse der cytogenetischen Untersuchung

In der cytogenetischen Analyse der Metaphasen II der fixierten Oocyten wurden sowohl strukturelle als auch numerische Aberrationen erfaßt.

Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich ist, konnten innerhalb der Gruppe der strukturellen Aberrationen folgende Aberrationstypen registriert werden: Gaps, Satellitenassoziati-

onen und zentrische Fusionen, Brüche und Fragmente, Deletionen und Interchanges. Die Satellitenassoziationen und zentrischen Fusionen, die in unserer Untersuchung zusammengefaßt wurden, da sie im Phasenkontrastmikroskop nicht eindeutig unterscheidbar sind, stellten in der Kontrolle mit elf Aberrationen die größte Untergruppe der strukturellen Chromosomenveränderungen dar. Im Gegensatz zur Versuchsgruppe konnten in der Kontrolle keine Interchanges nachgewiesen werden, während alle anderen oben aufgeführten Chromosomenveränderungen sowohl in der Kontrolle als auch im Versuch auftraten. Die Anzahl der Aberrationen erhöhte sich bei allen untersuchten Merkmalen im Versuch gegenüber der Kontrolle. Außer den Satellitenassoziationen und zentrischen Fusionen, die sich von 11 auf 18 erhöhten und damit auch im Versuch die stärkste Untergruppe der strukturellen Veränderungen der M II waren, stiegen alle anderen Aberrationstypen im Versuch um 2 - 3 Metaphasen an (Tabelle 4).

Insgesamt konnten in der Kontrolle 25 strukturelle Chromosomenveränderungen erfaßt werden, die sich im Versuch auf 42 erhöhten. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, stieg die Zahl der strukturell aberranten Metaphasen von 23 auf 38, das heißt, von 5,5 % in der Kontrolle auf 9,3 % der gesamten ausgewerteten Oocytenzahl, im Versuch an (inklusive Gaps). Schließt man die Gaps aus der Berechnung der Summe der M II mit strukturellen Aberrationen aus, so vergrößert sich die Anzahl der Metaphasen mit

Tabelle 4 : Übersicht über die strukturellen Chromosomenaberrationen

Serie	auswertbare MII	n M II mit strukturellen Aberrationen		Summe der Aberrationen	Gaps	SAT und zentrische Fusionen	Brüche und Fragmente	Deletionen	Interchanges
		incl. Gaps	excl. Gaps						
Kontrolle	422	23	19	25	5	11	7	2	0
Versuch	407	38	33	42	7	18	10	4	3

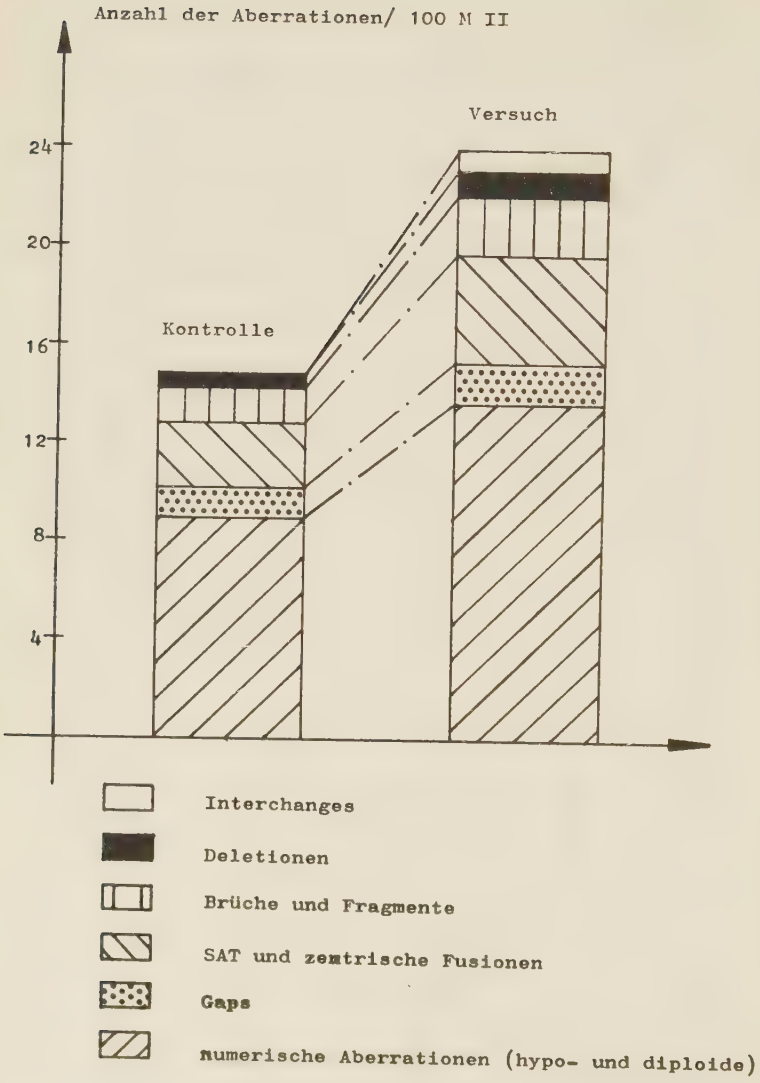


Abb. 13 : Anzahl der Aberrationen/ 100 M II

Chromosomenveränderungen von 19 auf 33, oder entsprechend von 4,5 % auf 8,1 %. Aus der Differenz der Prozentsätze der Chromosomenveränderungen inklusive oder exklusive Gaps zwischen Versuch und Kontrolle von etwa 3,9 % (inklusive Gaps) und 3,6 % (exklusive Gaps) läßt sich kein wesentlicher Unterschied beider Berechnungsweisen ableiten, der zu einer unterschiedlichen Interpretation der Ergebnisse führen könnte.
Die Differenz zwischen der Summe der Chromosomenaberrationen und der Anzahl der strukturell aberranten M II ist daraus zu erklären, daß Metaphasen, in denen zwei oder mehrere Aberrationen auftraten, nur einfach registriert wurden, während jede Chromosomenveränderung einzeln erfaßt wurde.

Bei der Auswertung der M II hinsichtlich numerischer Aberrationen erhöhte sich deren Zahl von 42 in der Kontrolle auf 55 im Versuch. In beiden Gruppen fand sich je eine diploide Metaphase. Es wurden nur solche Metaphasen als aneuploid gewertet, die der Bedingung 20 ± 2 genügten. Die Aberrationen mit 18er Chromosomensätzen erhöhten sich nur um eine, während die 19er Chromosomensätze von 30 in der Kontrolle auf 42 im Versuch anstiegen. Insgesamt wuchs die Zahl der numerischen Aberrationen von 10 % auf 13,5 % und entsprach damit etwa dem Anstieg der strukturell aberranten Metaphasen.

Der auf der Basis der Absolutwerte durchgeführten χ^2-Test ergab für die Summe der strukturell aberranten M II einen

P-Wert von $< 0,02$, was definitionsgemäß nicht als signifikant gewertet werden kann. Auch aus den P-Werten der Summe der in ihrer Struktur abweichenden Metaphasen läßt sich kein Unterschied in der Berechnung inklusive oder exklusive Gaps erkennen, da der P-Wert (exklusive Gaps) ebenfalls $< 0,02$ beträgt. Die Gruppe der numerisch aberranten Metaphasen erhielt im χ^2-Test einen P-Wert von $< 0,06$. Es zeigt sich also, daß die hier durchgeführte chronische Behandlung mit Trypaflavin nicht ausreicht, einen signifikanten Anstieg weder der numerisch noch der strukturell aberranten Metaphasen in der Einzelberechnung zu induzieren. Eine chronische Behandlung mit dem Acridinderivat erwies sich jedoch dann als signifikant, wenn man den χ^2-Test mit der Summe der numerisch und strukturell veränderten M II durchführte. Die Summe der aberranten Metaphasen erhöhte sich von 70 in der Kontrolle auf 86 im Versuch, das heißt, von 14,2 % auf 21,1 % der auswertbaren M II. Damit errechnete sich im χ^2-Test ein P-Wert von $< 0,01$. Damit erwies sich in den hier durchgeführten Versuchen das Acridinderivat Trypaflavin als ein Mutagen mit schwach signifikanter Wirkung auf die Eizellen adulter Tiere (Tabelle 5).

Da sich die Anzahl der Aberrationen in allen untersuchten Merkmalen, wie in der Summe der aberranten Metaphasen, der Summe der numerisch abweichenden Metaphasen, als auch in der Gruppe der strukturellen Aberrationen die Gaps, Satellitenassoziationen und zentrischen Fusionen, Brüche

Tabelle 5: Absolutwerte und Prozentsätze numerisch und strukturell aberranter M II; Ergebnisse des χ^2 - Testes.

Serie	n ausgewertete M II	n M II mit Aberrationen	%	aneuploide M II	%	n M II mit strukturellen Aberrationen			
						incl.Gaps	%	excl.Gaps	%
Kontrolle	422	60	14,20	42	10,00	23	5,45	19	4,50
Versuch	407	86	21,10	55	13,50	38	9,33	33	8,10
χ^2-Test		6,82		2,54		4,59		4,58	
P-Wert		<0,01		<0,06		<0,02		<0,02	

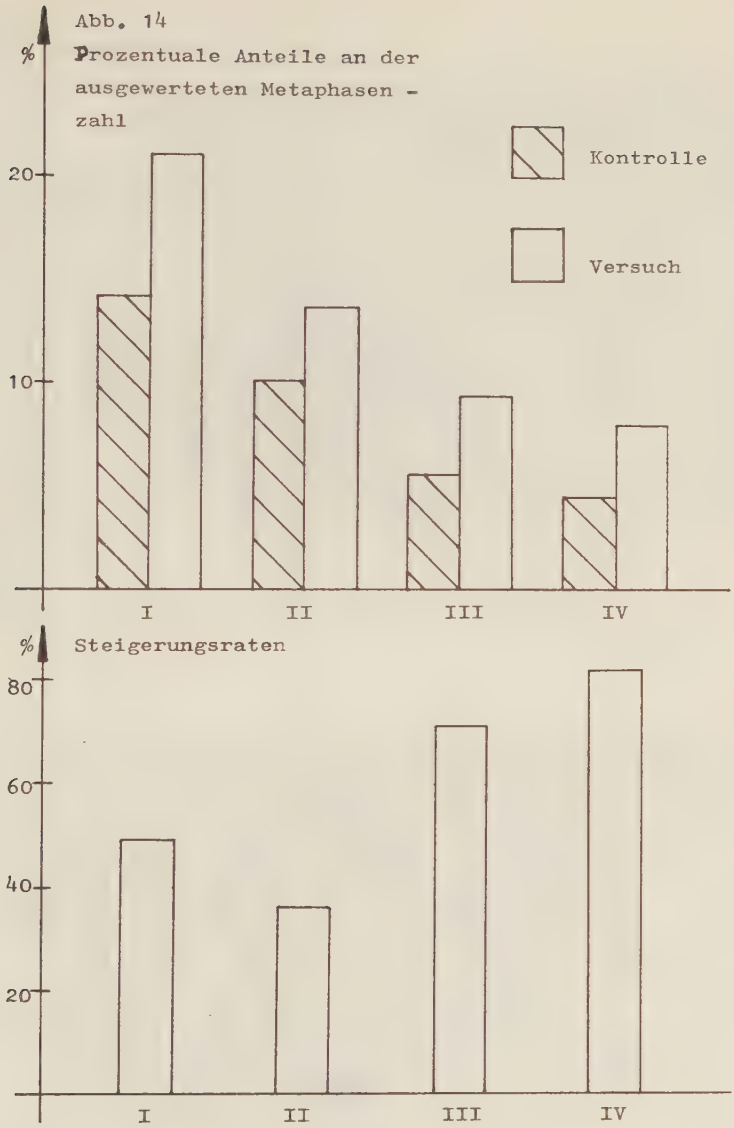
und Fragmente, Deletionen und Interchanges, erhöhte, errechnete sich im Zeichentest nach $P = \frac{1}{2}^n$ ein P-Wert von 0,02. Denn in einem Versuch mit mitlaufender Kontrolle ist die Wahrscheinlichkeit, daß bei Nichtmutagenität einer Verbindung die Werte einer Serie über bzw. unter dem jeweiligen Kontrollwert liegen, mit $\frac{1}{2}$ anzunehmen. Damit ist auch in diesem Test eine Signifikanz der Wirkung des Trypaflavin gegeben.

Anhand der Ergebnisse der Tabelle 3 kann man feststellen, daß sich sowohl die numerisch aberranten M II als auch die strukturellen Chromosomenveränderungen im Versuch deutlich erhöhten. Errechnet man, um welchen Prozentsatz sich die prozentualen Anteile der numerisch oder strukturell aberranten M II an der Zahl der auswertbaren Oocyten gegenüber der Kontrolle erhöhte, so ergibt sich eine Steigerung der strukturell aberranten Eizellen von 71,4 % inklusive Gaps, bzw. von 80,2 % exklusive Gaps. Da die Zahl der Metaphasen mit numerischen Aberrationen dagegen nur um 35,8 % gegenüber der Kontrolle wuchs, ist hiermit eine eindeutige Bevorzugung der Induktion struktureller Chromosomenaberrationen durch die hier durchgeführte Trypaflavinbehandlung innerhalb der Signifikanz der Summe der strukturellen und numerischen Aberrationen, wie sie auch aus der Abbildung 14 zu ersehen ist, gegeben.

Tabelle 6: Steigerungsraten der Chromosomenaberrationen des Versuchs gegenüber der Kontrolle in %

Serie	Summe der aberranten M II	strukturell aberrante M II inkl. Gaps	strukturell aberrante M II exkl. Gaps	numerisch aberrante M II
Steigerungsrate in %	49,3	71,4	80,2	35,8

Abb. 14



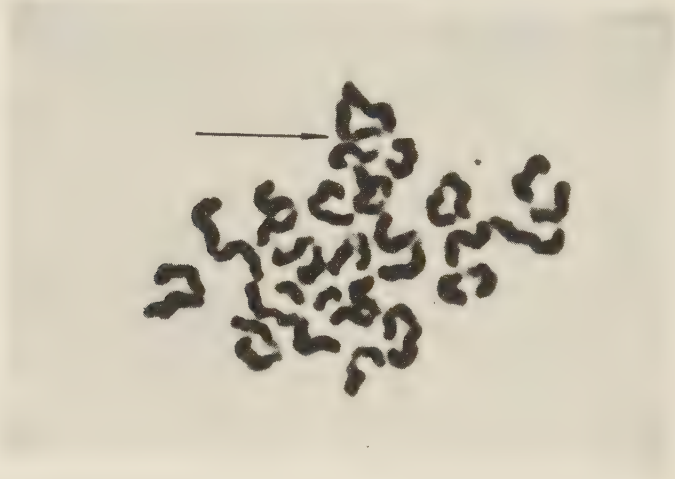
I = Summe der aberranten M II

II = aneuploide M II

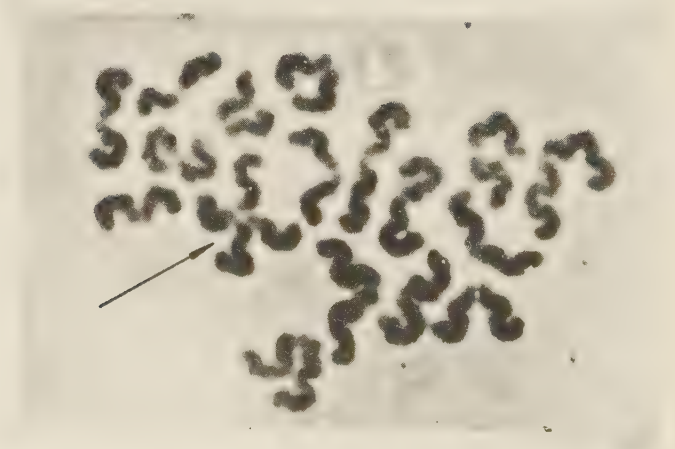
III = strukturelle Aberrationen inkl. Gaps (M II)

IV = strukturelle Aberrationen exkl. Gaps (M II)

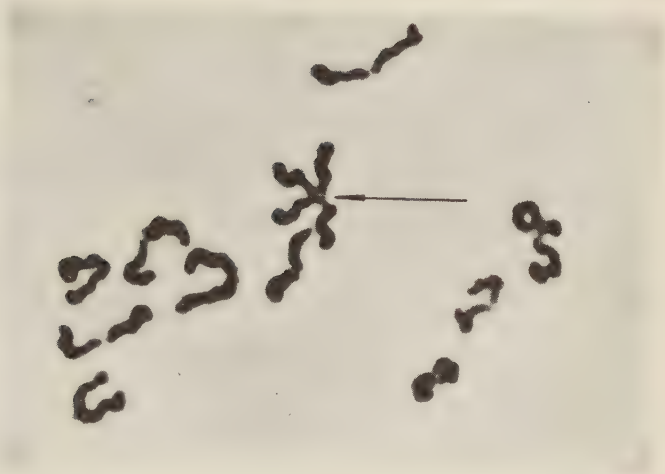
Abb. 15 a - h: Typen struktureller Chromosomenaberrationen in Metaphase II Oocyten adulter weiblicher Mäuse nach chronischer oraler Trypaflavinapplikation.



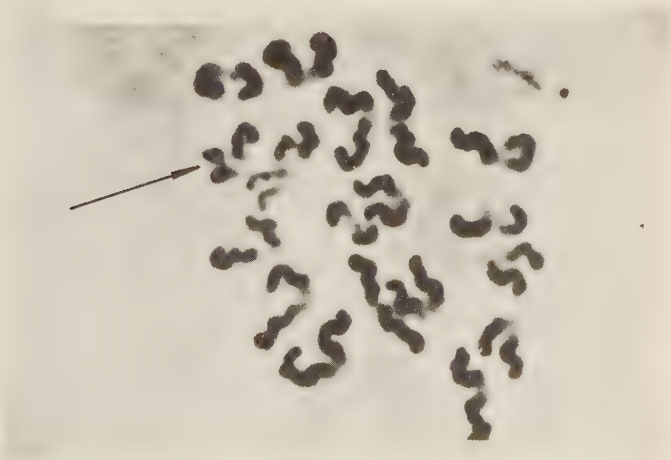
15 a Chromatidengap



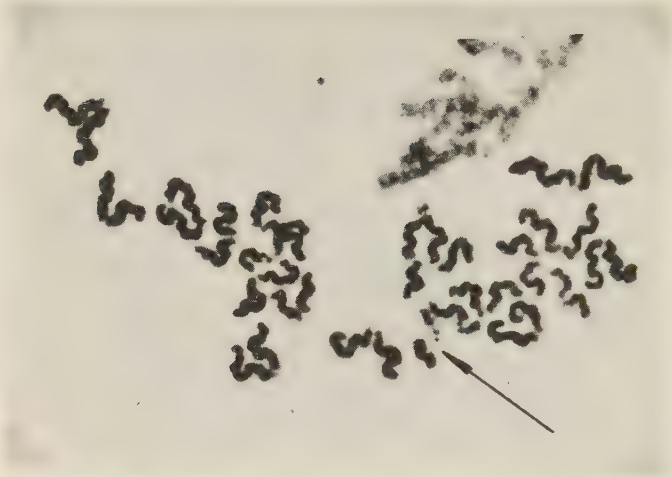
15 b Zentrische Fusion einer M II mit 18 Chromosomen



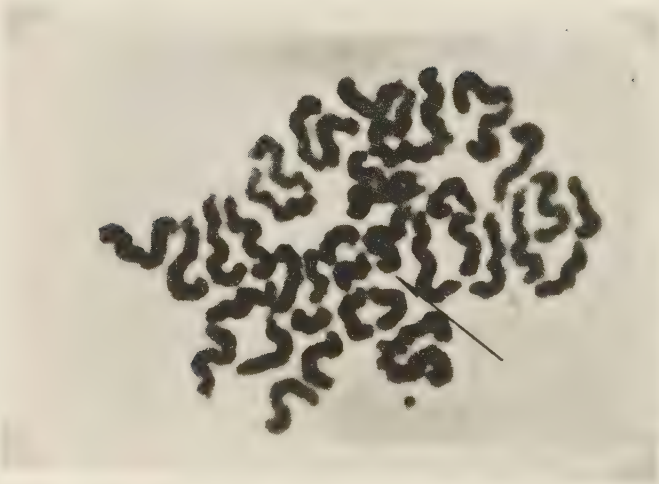
15 c Zentrische Fusion (Ausschnitt aus einer Metaphase mit 20 Chromosomen)



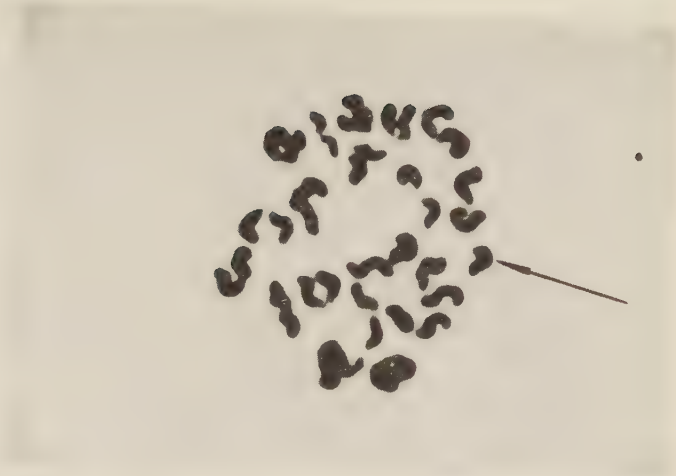
15 d Chromatidenbruch in einer Metaphase mit 19 Chromosomen



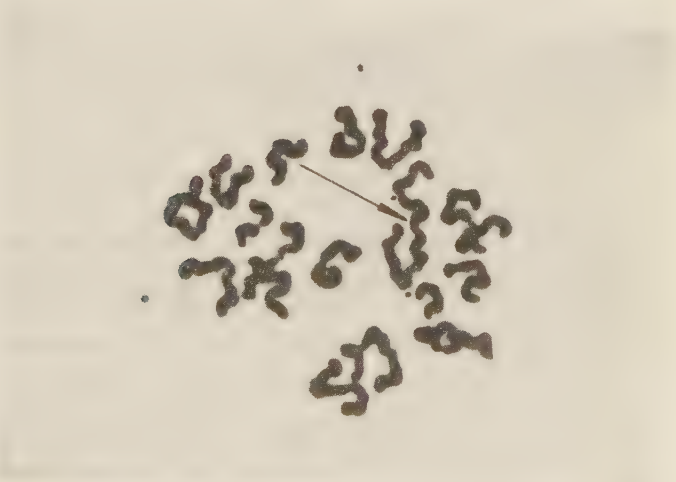
15 e Chromatidenbruch



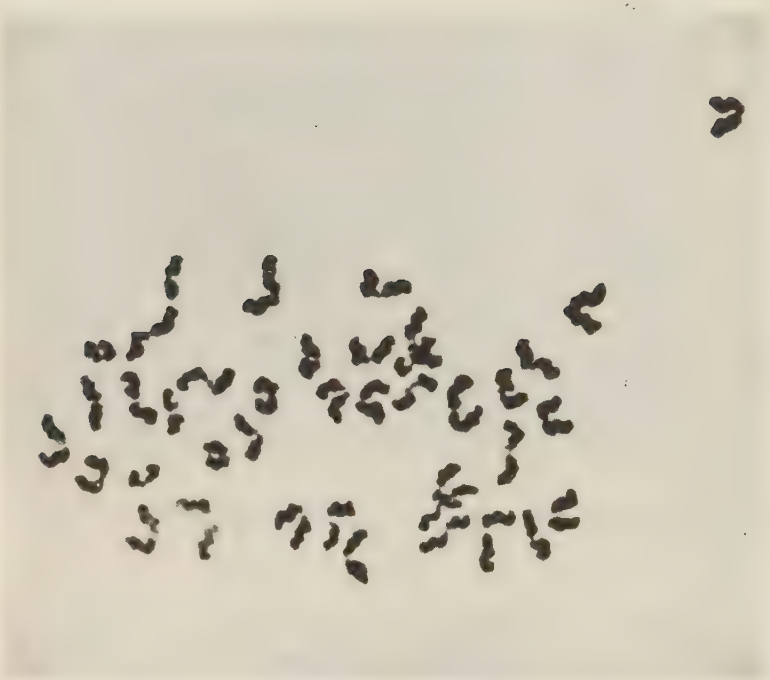
15 f Chromatidendeletion



15 g Chromatidendeletion



15 h Interchange (Centromere der am Interchange beteiligten Chromosomen sind angepunktet).



Diploide M II - Oocyte mit 40 Chromosomen nach chronischer oraler Trypaflavinapplikation adulter weiblicher Mäuse

4. Diskussion

Wie in Kapitel II ausführlicher dargestellt, berichten zahlreiche Autoren über eine Induktion von Genmutationen und Chromosomenaberrationen durch Acridinderivate. Für diese Untersuchungen wurden die verschiedensten Versuchsobjekte, am häufigsten Mikroorganismen,wie Bakterien und Viren,benutzt.

Durch eine Reihe physiochemischer Experimente klärten insbesondere Lerman (1961, 1963 a,b) und Luzzati et al. (1961) die Struktur des DNA-Acridinkomplexes auf. Brenner et al. (1961) legten dieses Modell ihrer Hypothese der Induktion von Insertionen und Deletionen durch Acridine während der Replikation zu Grunde, die jedoch in den Untersuchungen von Drake (1963, 1964) in Frage gestellt wurde. Gräslund et al. (1969) sahen die Wirkung der Acridine in einer Entstehung von Radikalen. Freese (1959) vermutete, daß Acridine Transversionen durchführen würden. Alle diese Untersuchungen waren wesentlich für die Aufklärung des Mechanismus der Acridinwirkung, lassen sich jedoch nur unter großen Vorbehalten auf den Menschen extrapolieren.

Daß Acridinderivate in somatischen Geweben Chromosomenveränderungen zu induzieren vermögen, wurde, wie in Kapitel II schon dargestellt, von Allison und Paton (1965) an menschlichen Lungenzellen und von Buchinger (1969) an HeLa-Zellen und Leukozyten nachgewiesen. Neben den Mutationen in somatischen Zellen sind die Veränderungen der Geschlechtszellen für den Menschen von besonderer Bedeutung, da in den Keimzellen stattfindende Mutationen auf kommende Generatio-

nen vererbt werden können. Da für chemische Mutagene sowohl Gewebs- als auch Stadienspezifitäten bestehen, können die an somatischen Zellen erhobenen Befunde nicht ohne weiteres mit den Veränderungen der Chromosomen in den Geschlechtszellen als gleichbedeutsam angesehen werden. Es erscheint wichtig, die für die mutagene Wirkung eines chemischen Agens besonders sensiblen Stadien der Spermatogenese und Oogenese herauszufinden und zeitlich genau festzulegen.
Das von Vogel und Röhrborn (1967) entwickelte Forschungsprogramm, wie es in der folgenden Zeichnung zu sehen ist, konnte auch der systematischen Untersuchung der möglichen mutagenen Wirkung von Trypaflavin auf die männlichen und weiblichen Geschlechtszellen der Maus zu Grunde gelegt werden.

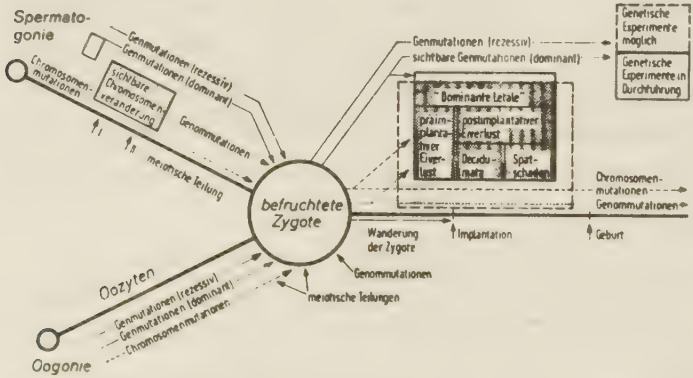


Abb. 16: Aus Vogel und Röhrborn, Mutationen durch chemische Einwirkungen bei Säuger und Mensch, 1967.

Nach diesem Schema wurden von Baldermann (1967) und Bucklacher (1969) die einzelnen Stadien der Reifung der Geschlechtszellen mit Trypaflavin behandelt und mit dem dominanten Letaltest ausgewertet. Ihre Ergebnisse seien an dieser Stelle kurz beschrieben.

4.1. Wirkung von Trypaflavin auf die Spermatogenese

Zur Klärung des Problems, ob Trypaflavin in den Gonaden Mutationen auszulösen vermag, liegen durchaus widersprüchliche Ergebnisse vor. So behandelte Edwards (1958) Mäusesperma mit Trypaflavin in vitro und stellte nach der Befruchtung unbehandelter weiblicher Tiere mit diesem Sperma keine Erhöhung der Mutationsrate fest.
Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu detaillierteren Untersuchungen von Baldermann (1967), der die Wirkung von Trypaflavin auf die Spermatogenese der Maus untersuchte. Baldermann ermittelte eine LD_{50} von 31.29 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht bei intraperitonealer Applikation des Stoffes und eine LD_{50} von 52.34 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht bei oraler Gabe des Acridinderivates. Dies gilt für eine einmalige Applikation.
Nach diesem Vorversuch wurden 9-12 Wochen alte männliche Mäuse mit 10 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht intraperitoneal oder mit 50 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht oral behandelt und anschließend im siebentägigen Abstand in Serien mit unbehandelten weiblichen Mäusen verpaart. Hierdurch wurde eine separate Beobachtung der einzelnen Teilschritte der Spermatogenese in Bezug auf die Wirkung der Trypaflavingabe

möglich. Zur Zeit der Behandlung befand sich das zur Befruchtung führende Sperma im Stadium der Spermatozoen, dasjenige, welches in Serie 2 und 3 zur Befruchtung führte, im Spermatidenstadium, das Sperma der Serien 4 und 5 im Entwicklungsstadium der Spermatocyten, von Serie 6 bis 8 im Stadium der Spermatogonien (Oakberg, 1955, 1956a, 1956b, 1957; Sirlin und Edwards, 1957). Hierbei wurde nur durch die orale Behandlung mit Trypaflavin ein signifikanter Anstieg der postimplantativen Eiverluste in allen Serien erreicht. Wie aus der folgenden Zeichnung zu ersehen ist, konnte eine Stadienspezifität der Trypaflavingabe, wie sie Röhrborn (1965b) zum Beispiel für Trenimon fand, nicht nachgewiesen

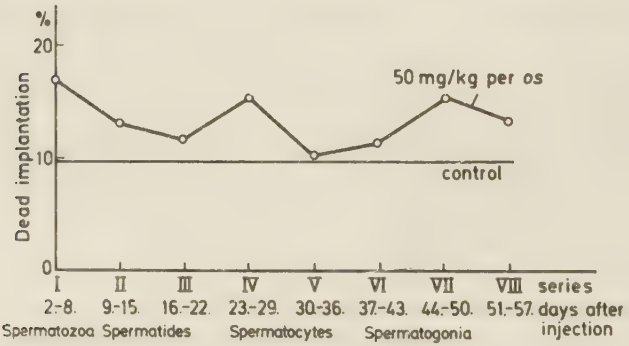


Abb. 17: Aus: Baldermann, zitiert nach Röhrborn und Vogel, Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch. Genetische Untersuchungen an der Maus, 1967.

werden. Der präimplantative Eiverlust gab keinen zusätzlichen Hinweis für einen mutagenen Effekt des Trypaflavins

bei akuter, oraler Applikation des Trypaflavin.
Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte Baldermann Trypaflavin in den Hoden männlicher Mäuse, die mit 10 oder 30 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht intraperitoneal behandelt worden waren, mehr oder weniger stark in allen Kernen der Spermatogenesezellen nachweisen. Dies korreliert mit der Tatsache, daß alle Stadien der Spermatogenese etwa gleich sensibel gegenüber der Behandlung mit Trypaflavin sind, wie es schon aus den Untersuchungen mit dem dominanten Letaltest hervorging. Die unterschiedliche Intensität der Trypaflavin induzierten Fluoreszenz der Kerne führte er auf die unterschiedliche Dichte des Kernchromatins zurück. Außerdem könnte eine weniger starke Fluoreszenz nach oraler Applikation des Trypaflavins darauf zurückzuführen sein, daß Trypyflavin nach der Darm-Leberpassage schon teilweise abgebaut ist.
Fahmy und Fahmy (1954), sowie Russel (1962) vermuteten Chromosomenaberrationen als Ursache für das Auftreten von dominanten Letalmutationen. Dies wurde erstmals von Röhrborn (1970) anhand einer zytogenetischen Untersuchung präimplantativer Stadien bewiesen. Schleiermacher fand in der Spermatogenese nach Mutagenexposition in M I Univalente. Ostertag und Kersten (1965) definierten Univalente als ungepaarte Chromosomen in der Diakinese. Sie entstehen entweder dadurch, daß das homologe Chromosom fehlt, oder die Chromosomenpaarung in der Prophase der Meiose ausbleibt (Asynapsis) bzw. durch vorzeitige Lösung der Paarung im Diplotän als Folge einer ausgebliebenen Chiasmabildung (Desynapsis).

Michaelis und Rieger (1963) sahen für das Auftreten der Desynapsis ein Fehlen oder eine vorzeitige Lösung der Chiasmabildung als Ursache an. Schleiermacher (1966 und 1970) wies darauf hin, daß nicht sichtbare Chromosomeninversionen, Deletionen und ähnliche Defekte für eine Verminderung der Chiasmafrequenz in Frage kommen könnten. Eine eindeutig erhöhte Rate von Univalenten und von Chromosomenaberrationen würde für eine mutagene Wirkung des Trypaflavin sprechen. Die Wirkung einer Univalenz ist eine gehäufte 'non-disjunction', was als dominanter Letalfaktor gelten kann. Baldermann untersuchte 10 - 12 Wochen alte männliche Mäuse, die mit 50 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht behandelt worden waren, am 21. - 23. Tag nach der Behandlung darauf hin, ob eine Erhöhung von Univalenten und Chromosomenaberrationen, wie Brüche, sowie als Ausdruck reziproker Translokationen Multivalente und atypische Bivalente auftrat. Hiermit wurden alle Spermatogonien vom Typ A und I erfaßt. Von 97 ausgewerteten M I trugen 15 Metaphasen Univalente gegenüber 3 Univalenten in 100 Kontrollmetaphasen. Hingegen zeigten sich in diesem Versuch nur 3 strukturelle Chromosomenaberrationen gegenüber keiner einzigen in der Kontrolle. Insgesamt ließ sich also eine Wirkung von Trypaflavin auf die Meiose der männlichen Maus nachweisen, da sich eine signifikant erhöhte Rate von Univalenten ergab.
Einschränkend zu diesen Univalenzuntersuchungen ist jedoch zu sagen, daß an der Bildung von Univalenten vor allem die X und Y Chromosomen beteiligt sind. Die Ursache für die große Neigung der Geschlechtschromosomen zur Univalenten-

bildung ist darin zu sehen, daß sie keine enge Paarung, sondern nur eine End - zu - Endassoziation eingehen.
Eine Übertragung der Verhältnisse der Spermatogenese auf die Oogenese ist generell nicht möglich, weil sich hier die Geschlechtschromosomen eng miteinander paaren. Sollten allerdings Univalente der M I grundsätzlich zu Fehlverteilungen von Chromosomen führen, so müßte sich das in den von mir überprüften M II - Oocyten in Form von hyper- oder hypoploiden Oocyten zeigen.

4.2. Wirkung von Trypaflavin auf die Oogenese

Brucklacher (1969) untersuchte, ob Trypaflavin bei weiblichen C3H Mäusen prä- und postimplantative Eiverluste zu induzieren vermag, und ob verschiedene Stadien der Eizellen gegenüber Trypaflavin besonders sensibel sind.

a) Bei einer einmaligen Gabe von 50 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht auf oralem Wege an 10 Wochen alte weibliche Mäuse und anschließender Verpaarung dieser Tiere mit unbehandelten männlichen Mäusen zeigte sich, daß die Raten der postimplantativen Eiverluste um diejenigen der Kontrolle schwankten. Die präimplantativen Eiverluste stiegen zwar ab dem 47. Tag nach der Behandlung an, - ein Maximum der präimplantativen Eiverluste lag bei den Verpaarungsserien des 61. - 67. Tages -, jedoch sind hierfür möglicherweise sowohl toxische Effekte der Trypaflavingabe als auch die zu geringe Anzahl von Versuchstieren in der Serie des 61. - 67. Tages verantwortlich. In diesem Test erwies sich also die einmalige Applikation von 50 mg Trypaflavin/kg

Körpergewicht auf oralem Wege an adulte weibliche Tiere als nicht mutagen. Die Ergebnisse Brucklachers stehen im Gegensatz zu Untersuchungen Baldermanns an 10 Wochen alten männlichen Tieren, da hier, wie schon beschrieben, bei derselben Behandlung ein stadienunspezifischer mutagener Effekt des Trypaflavin auf die Spermatogenese festgestellt werden konnte.

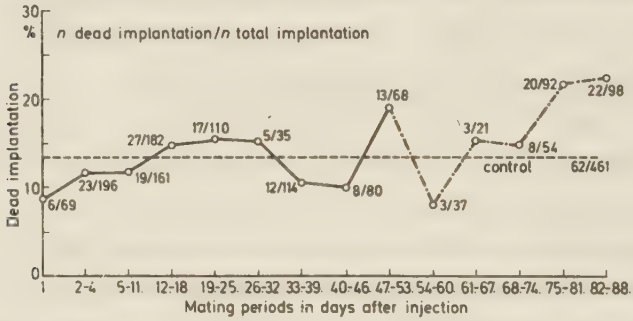


Abb. 18: Raten toter Implantate nach einmaliger oraler Applikation von 50 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht an 10 Wochen alte weibliche C3H Mäuse. Aus: Brucklacher, zitiert nach Buchinger, Mutagenicity Experiments with Mice and Human Cell Cultures: Treatment with an Acridine Derivate (Trypaflavin), 1970.

b) Da sich die Oocyten etwa von der Geburt bis zur Befruchtung in derselben Kernphase, nämlich der Prophase I, befinden, und die Kernphase für die jeweilige Wirkung des mutagenen Agens von ausschlaggebender Bedeutung sein kann, ist zu vermuten, daß die Befunde an 10 Wochen alten weiblichen C3H Mäusen mit denen an 3 und 4 Wochen alten Mäusen ge -

wonnenen Ergebnissen übereinstimmen. Eine entsprechende Gabe von 50 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht auf oralem Wege ergab dementsprechend auch keine Erhöhung der toten Implantate bei den 3 und 4 Wochen alten Tieren. Eine Abhängigkeit der Trypaflavinwirkung vom Körpergewicht der Tiere, wie sie bei den Untersuchungen mit Trenimon festgetsellt wurde, ergab sich ebenfalls nicht. Dies bestätigt die Vermutung, daß sich die Empfindlichkeit der Chromosomen gegenüber Trypaflavin innerhalb derselben Kernphase, auch wenn sie sich, wie das Dictyotän, über einen sehr langen Zeitraum erstreckt, nicht verändert.

c) Wenn man adulte weibliche Mäuse am 7., 11., 14. oder 15. Tag nach der Konzeption mit 50 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht oral behandelt, so erfaßt man mit dieser Behandlungsweise nach dem von Kuhlmann (1970) aufgestellten Schema des Ablaufes der Oogenese sowohl den Zeitraum, in dem sich die Oogonien der Embryonen durch rasche mitotische Teilungen vermehren, als auch die Kernphase, in der die Oocyten der Embryonen in die Prophase der ersten Reifeteilung eintreten. Anschließend werden die im Embryonen - alter intrauterin behandelten Mäuse im adulten Zustand verpaart und mit dem dominanten Letaltest untersucht. Eine derartige Behandlung mit Trypaflavin erhöhte die Rate der präimplantativen Eiverluste nur für den 7. Tag post conceptionem. Die Rate der toten Implantate war ebenfalls nur für den 7. Tag statistisch zu sichern. Dies spricht dafür, daß zwar die Oogonien, nicht aber die in die Prophase der Meiose eingetretenen Oocyten durch eine einmali-

ge orale Applikation von Trypaflavin mutagen verändert werden können. Hierbei zeigte sich auch, daß intrauterin behandelte männliche Mäuse der F_1 - Generation keine signifikante Erhöhung der präimplantativen Eiverluste und um die Kontrollwerte schwankende Raten von toten Implantaten aufwiesen.

d) Eine chronische orale Applikation von 2 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht/Tag bis zu einer Gesamtdosis von 100 mg Trypaflavin/kg Körpergewicht führte bei adulten weiblichen Mäusen zu einem signifikanten Anstieg toter Implantate. Die Raten der präimplantativen Eiverluste waren nicht deutlich von derjenigen der Kontrolle unterschieden. Ein Vergleich der Raten der toten Implantate chronisch behandelter weiblicher und männlicher adulter Tiere ergibt einen Unterschied derart, daß die Eizelle eindeutig mutagen beeinflußt wird, während eine Wirkung des Trypaflavin auf die Spermatogenese oder das seminifere Epithel nicht feststellbar ist.

Die Bewertung der Ergebnisse des dominanten Letaltestes ist problematisch. Zahlreiche exogene Einflüsse, wie Temperaturschwankungen, jahreszeitliche Einwirkungen, Infekte usw. können präimplantative Eiverluste und das Absterben der frühen Implantate verursachen. Außerdem können präimplantative Eiverluste nach einer Behandlung männlicher Tiere auch durch toxische Effekte der Behandlung induziert werden, die sich in Aspermie, welche das Entstehen der Zygote verhindern würde, Oligospermie und Inaktivierung des Spermas

äußern können (Röhrborn 1968). Aber auch vollkommen normal befruchtete Eier können wegen einer hormonellen Fehlstimulation des Uterusgewebes nach Behandlung von weiblichen Tieren einmal nicht zur Implantation gelangen (Bateman 1958 a,b). Außerdem können unbefruchtete Eier schon in den oberen Abschnitten des Eileiters zugrunde gehen. Selbst Schädigungen des Eiplasmas, des Uterus und der Adnexe können sich in einer Erhöhung der präimplantativen Eiverluste auswirken.

Würde man die Rate der präimplantativen Eiverluste jedoch außer Acht lassen, könnte man, da sich insbesondere stark wirkende Mutagene in einer Steigerung der präimplantativen Eiverluste äußern, die Stärke der mutagenen Wirkung derartiger Substanzen unterschätzen. Man sollte deshalb eine Erhöhung der präimplantativen Eiverluste nur als Hinweis auf eine mutagene Wirkung bewerten (Röhrborn 1970).

Auch die Rate der postimplantativen Eiverluste könnte durch Endometriumläsionen u.ä. verändert werden, ohne daß dominante Letalfaktoren dafür verantwortlich sein müssen.

Die Methode des dominanten Letaltestes erfaßt sicherlich nur einen Teil der genetischen Defekte. Nicht jede Veränderung des genetischen Materials muß zum Absterben der Zygote führen. Das Auftreten von dominanten Letalmutationen kann auf verschiedene genetische Defekte zurückzuführen sein, deren Differenzierung im dominanten Letaltest nicht möglich ist. Embryonen, die kurz vor oder nach der Implantation als Folge mehrerer dominanter Letalmutationen abstarben, führen in der Auswertung des dominanten Letaltestes zu einer geringeren Zahl von Eiverlusten als es dem Vorkommen

genetischer Defekte entspricht. Dies gilt nicht für schwache Mutagene, wie das in dieser Arbeit verwendete Trypaflavin. Aber besonders bei der Untersuchung starker Mutagene und hinsichtlich der Möglichkeit, eine Dosis/Effekt-Beziehung aufzustellen, ist dies höchst problematisch.
Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, die Ergebnisse der chronischen oralen Trypaflavinapplikation, die mit dem dominanten Letaltest erhoben wurden, durch die cytogenetische Analyse der Chromosomen der M II-Oocyten zu verifizieren.

In dieser cytogenetischen Untersuchung wurden sowohl numerische als auch strukturelle Aberrationen erfaßt. Es wurden nur solche numerisch aberranten Metaphasen ausgewertet, die in der Zahl ihrer Chromosomen der Bedingung 20 ± 1 bzw. 20 ± 2 genügten. Innerhalb der Gruppe der strukturellen Aberrationen wurden folgende Aberrationstypen getrennt ausgewertet: Gaps, Satellitenassoziationen und zentrische Fusionen, Brüche und Fragmente, Deletionen und Interchanges.
Es zeigte sich, daß die Summe der numerisch und strukturell aberranten Metaphasen von etwa 14 % in der Kontrolle auf etwa 21 % im Versuch anstieg. Die aneuploiden Metaphasen erhöhten sich von 10 % in der Kontrolle auf 13,5 % im Versuch. Dies entsprach etwa dem Anstieg der Metaphasen mit strukturellen Aberrationen, die sich von etwa 5,5 % in der Kontrolle auf etwa 9,3 % im Versuch erhöhten, wenn man die Gaps mit einbezieht, bzw. von 4,5 % auf 8,1 % exclusive Gaps (Tabelle 5).

Im χ^2-Test ergab sich sowohl für die Gruppe der numerischen als auch der strukturellen Aberrationen bei Einzelberechnung keine Signifikanz. Die durchgeführte chronische Trypaflavinbehandlung erwies sich jedoch dann als signifikant mutagenitätsinduzierend, wenn man den χ^2-Test mit der Summe der numerisch und strukturell aberranten Metaphasen durchführte ($P < 0,01$).

In allen untersuchten Merkmalen wurde durch die Trypaflavinapplikation eine Erhöhung der Zahl der Aberrationen erzielt. Dies galt sowohl für die Summe der aneuploiden Metaphasen als auch innerhalb der Gruppe der strukturellen Aberrationen für Gaps, Satellitenassoziationen und zentrische Fusionen, Brüche und Fragmente und Deletionen und Interchanges. Da alle Versuchswerte über denen der Kontrolle lagen, errechnete sich im Zeichentest nach $P = \frac{1}{2}^n$ ein P-Wert von 0,02. Hieraus ergibt sich eine weitere statistische Absicherung der Ergebnisse, in denen sich eine schwache mutagene Wirkung des Trypaflavin erkennen ließ.

Innerhalb der Gruppe der strukturellen Chromosomenaberrationen erhöhten sich die aberranten Metaphasen im Versuch in allen untersuchten Merkmalen um 2 - 3 Metaphasen gegenüber der Kontrolle. Während der Anstieg der Gaps ohne Auswirkung auf die weitere Entwicklung der Eizelle bleibt, da kein Substanzverlust des Chromosoms oder eine Mutation im eigentlichen Sinne, sondern nur eine färberische Lücke vorliegt, dürfte die Erhöhung der Metaphasenzahl mit Satellitenassoziationen und zentrischen Fusionen, Brüchen,

Fragmenten, Deletionen und Interchanges in vielen Fällen zum Absterben der Zygote vor der Implantation bzw. in der Embryonalentwicklung führen. Zu derartigen dominanten Letalmutationen können sowohl Brüche als auch das Auftreten größerer Chromosomenfragmente führen, die in den folgenden mitotischen Teilungen verlorengehen.
Die in der cytogenetischen Analyse gefundenen Deletionen, die als das Produkt von Brüchen und der Entstehung eines zentrischen Chromosoms und eines azentrischen Chromosomenfragmentes anzusehen sind, welches in der Regel verlorengeht, da es keine Ansatzstelle für die Spindel besitzt, sind in seltenen Fällen zwar mit dem Leben vereinbar, führen dann aber zu schweren Mißbildungen. Als Beispiel sei das beim Menschen bekannte Cri-du-chat-Syndrom genannt, bei dem eine Deletion eines kurzen Armes des Chromosoms 5 vorliegt.
Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß die Erfassung von Chromosomendeletionen in der Analyse der M II-Oocyten der Maus nicht möglich ist, da der normale Karyotyp der Maus nur aus akrocentrischen Chromosomen besteht, und somit Isodeletionen nicht erkennbar sind. Alle in Tabelle 4 aufgeführten Deletionen sind vom Chromatidtyp.
Sowohl in der Kontrolle als auch im Versuch stellte die Gruppe der Satellitenassoziationen und zentrischen Fusionen mit 11 bzw. 18 Aberrationen die stärkste Untergruppe der strukturellen Chromosomenaberrationen dar. Sie wiesen auch mit einer Steigerung um 7 Aberrationen den stärksten Zuwachs auf. Hierbei ist zu erwähnen, daß die Unterscheidung

einer Satellitenassoziation (Annäherung der Zentromere zweier Chromosomen) von einer echten zentrischen Fusion im Phasenkontrastmikroskop sehr schwierig, wenn nicht gar unmöglich ist. Eine Unterscheidung wäre jedoch durch eine Goldbedampfung der Chromosomen und Schräglichtillumination möglich. Hierbei stellen sich die Centromere plastisch in Form kleiner Kügelchen dar. Somit ist eine einwandfreie Differenzierung zwischen Satellitenassoziationen und zentrischen Fusionen möglich. Das Verfahren scheint jedoch für Routinefragen zu aufwendig.

Die in dieser Untersuchung gefundenen zentrischen Fusionen können folgendermaßen entstanden sein:

a. Es entstehen zwei Brüche in der Nähe der Centromere akrozentrischer Chromosomen, einer in den langen Armen des einen, der andere in den kurzen Armen des anderen Chromosoms. Infolge einer reziproken Translokation entsteht ein metazentrisches Chromosom, das die langen Arme beider Chromosomen enthält, und ein kleines Chromosom, das gewöhnlich verloren geht.

b. Es entstehen zwei Brüche in den kurzen Armen akrozentrischer Chromosomen. Durch eine reziproke Translokation entsteht ein metazentrisches Chromosom mit zwei Zentromeren, die so nahe beieinander liegen, daß sie als eine Einheit wirken, und ein azentrisches Chromosom, welches verloren geht. Auch dadurch, daß zwei akrozentrische Chromosomen in ihren Centromeren brechen und die Bruchstücke eine reziproke Translokation eingehen, erfolgt die Bildung eines metazentrischen Chromosoms, das die

langen Arme der akrozentrischen Chromosomen enthält (Rieger, Michaelis und Green 1976).

In jedem Falle entsteht aus zwei akrozentrischen Chromosomen ein metazentrisches Chromosom, das die beiden langen Arme der akrozentrischen Chromosomen enthält und ein reziprokes Translokationsprodukt, das verlorengeht. Obwohl beim Menschen den Trägern derartiger Translokationen das genetische Material der kurzen Arme fehlt, sind sie meistens phänotypisch normal. Es kann deshalb angenommen werden, daß der Informationsgehalt der kurzen Arme so gering ist, daß er für eine normale Entwicklung keine Rolle spielt (Buselmaier 1974).

In der F_1-Generation kann es während der Meiose zu schwerwiegenden Veränderungen kommen: Das Translokationschromosom, das aus den langen Armen zweier akrozentrischer Chromosomen besteht, paart sich in der ersten meiotischen Reifeteilung mit den beiden homologen akrozentrischen Chromosomen. Hierdurch bildet sich ein Trivalent, bei dem eine exakte Verteilung der homologen Chromosomen auf die Spindelpole nicht gewährleistet ist. Dadurch können Geschlechtszellen mit balancierten und nicht balancierten Chromosomensätzen entstehen.

Heute wird allgemein angenommen, daß die Vereinigung zweier akrozentrischer Chromosomen zu einem metazentrischen Chromosom bei der Artenentwicklung eine wesentliche Rolle gespielt hat. Gerade Tierarten mit großen Chromosomenzahlen zeichnen sich durch akrozentrische Chromosomen aus, während der Mensch mit relativ wenigen Chromosomen einen

größeren Prozentsatz metazentrischer Chromosomen besitzt. An der beständigen und vererbbaren Verringerung der Chromosomenzahl dürften Robertsonsche Translokationen, worunter man eine Verschmelzung nicht homologer akrozentrischer Chromosomen zu einem metazentrischen Chromosom versteht, in hohem Maße beteiligt gewesen sein.

Innerhalb der Gruppe der numerischen Aberrationen wurden keine hyperploiden Metaphasen, sondern ausschließlich hypoploide mit 18 oder 19 Chromosomen gefunden. Die Zahl der aneuploiden M II erhöhte sich von 42 in der Kontrolle auf 55 im Versuch, wobei die Zahl der 18-er Chromosomensätze nur um eine Metaphase anstieg. Da keine einzige hyperploide Metaphase gefunden werden konnte, ist es vorstellbar, daß das vermehrte Auftreten hypoploider Chromosomensätze auf präparatorisch bedingte Artefakte zurückzuführen sein kann. Dies würde allerdings die Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle nicht erklären. Außerdem könnte für das Überwiegen der hypoploiden Metaphasen im Versuch das sogenannte 'anaphase laging' eine Rolle spielen.

Die Bedeutung derartiger Hypoploiden ist aus den Untersuchungen von Knörr und Knörr-Gartner (1977) über Chromosomenaberrationen bei Aborten, die das Alter der 16. Schwangerschaftswoche nicht überschritten hatten, zu erkennen. Hier sind Trisomien, Monosomien und Polyploidien mit einer Häufigkeit von 45,3 % bzw. 27,4 % und 12,6 = angegeben. Unter den Aneuploidien sind die Gonosomen gegenüber den Autosomen mit etwa 35 % zu 65 % beteiligt. Unter den gonosomalen Anomalien herrscht die Monosomie

X mit 90% eindeutig vor. In seltenen Fällen führt eine Monosomie X zur Geburt. Gonosomale Trisomien bei Aborten sind sehr selten; wahrscheinlich, weil ihre Überlebenschancen größer sind.

Bei den autosomalen Aberrationen herrschen Trisomien mit über 60% vor. Sie gelangen selten als Pätau-, Edwards- oder Down-Syndrom zur Geburt. Autosomale Monosomien werden im Abortmaterial selten gefunden, da sie schon früh nach der Geburt zugrunde gehen dürften.

Unter den numerischen Aberrationen fand sich sowohl in der Kontrolle als auch im Versuch je eine diploide Metaphase. Die Enstehungsmodi diploider Oocyten, die nach der Befruchtung zu triploiden Zygoten führen, sind in der Einleitung schon erläutert worden. Sie stellen ebenfalls Letalmutationen dar.

Aus den P-Werten des χ^2-Testes läßt sich erkennen, daß die Gruppe der strukturellen Aberrationen einen P-Wert besitzt, der näher an der als signifikant anerkannten Grenze von $P<0,01$ liegt als derjenige der numerischen Aberrationen. Errechnet man, um welchen Prozentsatz sich die prozentualen Anteile der Aberrationen an der gesamten ausgewerteten Metaphasenzahl im Versuch gegenüber der Kontrolle gesteigert hat, so läßt sich leicht eine Bevorzugung der strukturellen gegenüber den numerischen Aberrationen erkennen (Tabelle 6). Die strukturell aberranten M II steigern sich um etwa 70% (inklusive Gaps), bzw. etwa 80% (exklusive Gaps), während sich die numerisch aberranten Metaphasen nur um etwa 36% steigern. Damit ist eine bevor-

zugte Induktion struktureller Chromosomenaberrationen durch Trypaflavin festzustellen.

Da sowohl numerische als auch strukturelle Aberrationen zum Absterben der Zygote führen können, müßte der prozentuale Anteil der Summe der aberranten Metaphasen an der Zahl der insgesamt ausgewerteten M II und die Prozentsätze der toten Implantate im dominanten Letaltest korrelieren. An dieser Stelle scheint nun ein Vergleich der postimplantativen Eiverluste mit den Ergebnissen der zytogenetischen Analyse der M II-Oocyten angebracht, da die präimplantativen Eiverluste, wie schon ausführlicher dargestellt wurde, aus verschiedenen Gründen ansteigen können. Ein weiterer Grund ist darin zu sehen, daß insbesondere schwache Mutagene, und als solches muß Trypaflavin nach den bisher vorliegenden Ergebnissen angesehen werden, sich in einer Erhöhung der postimplantativen Eiverluste äußern.

Brucklacher erzielte bei chronischer oraler Applikation von Trypaflavin mit dem dominanten Letaltest eine Steigerung der postimplantativen Eiverluste von 10,5 % in der Kontrolle auf 21,7 % im Versuch. Die präimplantativen Eiverluste stiegen von 8,8 % in der Kontrolle auf 13,3 % im Versuch an, und gaben damit ein zusätzliches Indiz für eine mutagene Wirkung des Trypaflavin. Wenn auch die Steigerung der Chromosomenaberrationen in der zytogenetischen Analyse mit einem Anstieg von 14,2 % in der Kontrolle auf 21,1 % im Versuch nicht so deutlich ausfiel wie der Anstieg der toten Implantate in den Untersuchun-

gen von Brucklacher, so läßt sich doch mit Sicherheit feststellen, daß das Auftreten von toten Implantaten nicht auf toxische Effekte der applizierten Substanz oder andere nicht mutagene Einflüsse zurückzuführen ist, sondern eindeutig als Ausdruck dominanter Letalmutationen infolge von Chromosomenaberrationen zu werten ist.

Es scheint von wesentlichem Interesse, ob der sowohl von Brucklacher als auch in der zytogenetischen Analyse festgestellte schwach mutagene Effekt der chronischen oralen Trypaflavinbehandlung beständig ist, oder ob er sich nach einigen Ovulationen charakteristisch verändert bzw. möglicherweise sogar verschwunden ist. So untersuchten Röhrborn und Hansmann (1974) Chromosomenveränderungen der Eizellen der Maus nach Behandlung mit verschieden hohen Dosen von oralen Kontrazeptiva. Die Untersuchungen erfolgten mit dem dominanten Letaltest und zytogenetischer Analyse der M II-Oocyten, sowohl unmittelbar als auch 7 - 9 Wochen nach dem Ende der Behandlung.
Die 4 Wochen lang applizierten Dosen von Norethisteronacetat verursachten in der hochdosierten Gruppe der Untersuchungstiere, daß bis zum 7. Tag nach der Behandlung keine Oocyten bei der Ovulation gefunden werden konnten. Die Zahl der Oocyten war in der ersten Analyse gegenüber der zweiten Analyse (7. - 9. Woche nach Behandlungsende) leicht, aber nicht signifikant erniedrigt. Die Ovulationen traten unregelmäßig auf. Auch in der niedrig dosierten Gruppe war die Zahl der ovulierten Oocyten unmittelbar

nach der Applikation erniedrigt. Nach 7 - 9 Wochen stieg die Zahl der ovulierten Oocyten/Tier wieder an, und zwar auf einen durchschnittlich höheren Wert als in der Kontrolle.

In der zytogenetischen Untersuchung stieg die Frequenz der strukturellen Chromosomenanomalien nicht an. Bei den numerischen Aberrationen konnte eine eindeutige Dosis-Effekt-Beziehung nachgewiesen werden. In der höher dosierten Gruppe war die Zahl der non-disjunction-Prozesse nach der Behandlung signifikant erhöht und blieb auch nach 7 - 9 Wochen auf diesem Niveau, während sich in der niedriger dosierten Gruppe ein subsignifikanter Anstieg der aneuploiden M II nur für die Ovulationen unmittelbar nach dem Ende der Behandlung ergab und in der zweiten Analyse nicht mehr nachweisbar war. Damit schien auch die Existenz eines Schwellenwertes für niedrige Hormondosen gegeben.

Es wäre wichtig, in ähnlichen Experimenten zu untersuchen, ob Trypaflavin derartige Veränderungen mit der Stärke der applizierten Dosis ebenfalls aufweist.

5. Zusammenfassung

Trypaflavin erwies sich in den von Baldermann und Bruck-lacher mit Hilfe des dominanten Letaltestes durchgeführten Untersuchungen als eine chemische Substanz mit schwach mutagenem Effekt.

Eine chronische Behandlung adulter weiblicher Mäuse mit einer Gesamtdosis von 100 mg Trypaflavin/kg Körperge - wicht bewirkte im dominanten Letaltest in signifikanter Weise eine Erhöhung der Rate der postimplantativen Eiver-luste.

In der in dieser Arbeit durchgeführten cytogenetischen Untersuchung der M II - Oocyten konnte unter den gleichen Bedingungen festgestellt werden, daß für den im dominanten Letaltest aufgetretenen Anstieg der toten Implantate numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen ursächlich verantwortlich sind. Hierbei korrelierte die Steigerung der Chromosomenaberrationen von 14,2 % in der Kontrolle auf 21,1 % im Versuch mit dem Anstieg der post-implantativen Eiverluste im dominanten Letaltest von 10,5 % in der Kontrolle auf 21,7 % im Versuch.

Im χ^2-Test konnte bei Einzelerfassung struktureller bzw. numerischer Aberrationen keine signifikante mutagene Wirkung der Trypaflavinapplikation festgestellt werden. Die Summe der Chromosomenaberrationen ergab jedoch im χ^2-Test mit einem P Wert von $< 0{,}01$ ein deutliches Indiz für die signifikant mutagene Wirkung des Trypaflavin.

Sowohl die numerischen als auch die strukturellen Chromo-

somenaberrationen stiegen im Versuch gegenüber der Kontrolle deutlich an. Die Summe der Aberrationen erhöhte sich nach der Trypaflavinapplikation im Versuch um etwa 50%. Es zeigte sich eine bevorzugte Induktion struktureller Aberrationen, die im Versuch um etwa 70% (inklusive Gaps) bzw. 80% (exklusive Gaps) anstiegen, gegenüber den numerisch veränderten Metaphasen, die sich nur um etwa 35% erhöhten.
Innerhalb der Gruppe der strukturellen Aberrationen wurden Gaps, Satellitenassoziationen und zentrische Fusionen, Brüche und Fragmente, Deletionen und Interchanges erfaßt. In allen untersuchten Merkmalen stieg die Anzahl der Chromosomenaberrationen im Versuch an. Hieraus ergab sich in der statistischen Berechnung mittels des Zeichentestes ein P-Wert von 0,02. Dies ist ein weiteres Indiz für eine eindeutige mutagene Wirkung von Trypaflavin.

Trypaflavin kann demnach als ein schwach wirkendes Mutagen angesehen werden. Es findet in der heutigen Therapie in verschiedener Form weitverbreitete Anwendung. Die in den vorliegenden Experimenten mutagen wirkenden Dosen können von Patienten leicht aufgenommen werden, da schon eine stündliche Gabe von 2 Pastillen Panflavin einer aufgenommenen Tagesdosis von etwa 80 - 100mg Trypaflavin entspricht.
Bei der Therapie sollte man einzelne hohe Dosierungen von Trypaflavin bei Männern und insbesondere bei Frauen im gebärfähigen Alter vermeiden. Die Schwangerschaft ist

eine eindeutige Kontraindikation gegen eine medikamentöse Therapie in hohen Dosen mit Trypaflavin enthaltenden Medikamenten, da hier besonders die Oogonien weiblicher Feten mutagen verändert werden können. Durch die rasche mitotische Teilung und Vermehrung der mutagen veränderten Oogonien kommt es zu einem häufigeren Auftreten von Chromosomen- und Genomveränderungen der Oocyten intrauterin behandelter weiblicher Tiere der F_1 - Generation.
Eine chronische Behandlung mit Trypaflavin kann als Ursache von Fehlgeburten beim Menschen angesehen werden. Dabei scheint es unwesentlich, ob diese Fehlgeburten durch den mutagenen Effekt der Trypaflavinapplikation auf die Oocyten oder durch deren teratogene bzw. cytotoxische Effekte auf Uterus und Adnexe verursacht werden. (Brucklacher 1969). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint es sicher zu sein, daß die Induktion von Fehlgeburten durch Trypaflavin durch Chromosomenaberrationen verursacht wird.
Als lokal angewendetes Desinfiziens der äußeren Haut kann Trypaflavin maligne Mutanten erzeugen, wenn gleichzeitig eine starke Lichtexposition besteht (Buchinger 1970).

Ob andere Acridine mit Trypaflavin vergleichbare Effekte bewirken, ist meines Wissens noch nicht untersucht worden. Bevor Experimente keine andersartigen Hinweise ergeben, sollte man dieselbe Vorsicht wie in der Behandlung mit Trypaflavin auch in der Therapie mit anderen Acridinderivaten anwenden.

6. Literaturverzeichnis

Albert, a.: The acridines. Their präparation, physical, chemical, and biological properties and uses. 1st edition, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London 1951.

- The acridines. Their präparation, physical, chemical, and biological properties and uses. 2nd edition, Edward Arnold (Publishers) Ltd., London 1966.

Allison, A.C. und Paton, C.R.: Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. Nature (Lond.) 207, 1170-1173 (1965).

Altenburg, L.S.: The production of mutations in Drosophila by tertiary-butyl hydroperoxide. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 40, 1037-1040 (1954).

Baldermann, K.H.: Untersuchungen über eine mögliche mutagene Wirkung von Trypaflavin bei der Maus. Inaug.-Diss. Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg, 1967.

- Röhrborn, G. und Schröder, T.M.: Mutagenitätsuntersuchungen mit Trypaflavin und Hexamethylentetramin am Säuger in vivo und in vitro. Hum. Genet. 4,112-126 (1967).

Bateman, A.J.: Mutagenic sensitivity of maturing germ cells in the male mouse. Heredity 12, 213-232 (1958a).

- The partition of Dominant Lethals in the mouse between unimplanted eggs and deciduomata. Heredity 12, 467-475 (1958b).

Beers, R.F. und Armilei, G.: Heterogeneous binding of acridine orange by polyribonucleotides. Nature 208, 466-468 (1965).

Borum, K.: Oogenesis in the mouse. Exp. Cell. Res. 24, 459-507 (1961).

Boué, J.G., Boué, A., und Lazar, P.: The epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal anomalies, their biology and pathology. In: Blandau, R.J. (Ed.) Basel-New York: Karger 1975.

Brenner, S., Barnett, L., Crick, F.H.C., und Orgel, A.: The theory of mutagenesis. J. Mol. Biol. 3, 121-124 (1961).

Brøgger, A.: Apparently spontaneous chromosome damage in human leukozytes and the nature of chromatidgaps. Humangenetik 13, 1-14 (1971).

Brucklacher, M.: Untersuchungen zur Induktion von prä- und postimplantativen Eiverlusten durch Behandlung virginer weiblicher C3H-Mäuse. Inaug.-Diss. Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg, 1969.

Buchinger, G.: Die Wirkung von Trypaflavin allein und in Kombination mit sichtbarem Licht auf die Chromosomen von HeLa-Zellen und menschlichen Leukozyten. Humangenetik 7, 323-336 (1969).

- Mutagenicity Experiments with Mice and Human Cell Cultures: Treatment with an Acridine Derivate (Trypaflavin). In: Vogel, F. und Röhrborn, G. (Eds.), Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 350-366, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970.

Buselmaier, W.: Biologie für Mediziner, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1974.

Butler, J.A.V. und Conway, B.E.: The action of photochemically generated radicals from hydrogen peroxide on deoxiribonucleic acid and simple model substances. Proc. Roy. Soc. London B 141, 562-580 (1953).

Carr, D.H.: Chromosomes after oral contraceptives. Lancet II 830-831 (1967).

- Chromosomes and abortion. Advanc. Hum. Genet. 2, 201-259 (1971).

Cohen, S.S., Flaks, J.G., Barner, H.D., Loeb, M.R. und Lichtenstein, J.: The mode of action of 5-fluoro - uracil and its derivates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44, 1004-1012 (1958).

D' Amato, F.: Studio dell attitiva mutagena dell' acridina e derivati. Cryologia 2, 229-297 (1950).

Drake, J.W.: Properties of ultraviolet inducing rII mutants of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 6,268-283 (1963).

- Studies on the induction of mutations in bacteriophage T4 by ultraviolet irradiation and by proflavin. J. Cell. Comp. Physiol. 64, Suppl.1, 19-32 (1964).

- The molecular basis of mutation. San Francisco, Holden Day 1970.

Dubinin, N.P., Sidorov, B.N., und Sokolov, N.N.: Physicochemical and struktural bases of biological phenomena. Acad. Sci. USSR 142, (1961).

Edwards, R.G.: The experimental induction of gynogenesis in mouse. II. Treatment of sperm with Trypaflavin, toluidin blue or nitrogen mustered. Pro. roy. Soc. B 149, 117-129 (1958).

Evans, H.J.: Chromosome aberrations and the target theory. In: Wolff, S. (Ed.), Radiation induced Chromosome Aberrations. New York: Columbia University Press, 8-40 (1963a).

- Possible reasons for variation in chromosome radio - sensitivity during mitotic and meiotic cycles. In: Sobels, F. (Ed.), Repair from Genetic Radiation Damage. Oxford: Pergamon Press, 31-49 (1963b).

Fahmy, O.G. und Fahmy, M.J.: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumor inhibitors in Drosophila melanogaster. II. The mechanism of induction of dominant lethals by 2,4,6-tri(ethyleneimino)-1,3,5-triazine. J.Genet. 52, 603-619 (1954).

Fahrig, R.: Nachweis einer Wirkung von Organophosphor - Insektiziden. Naturwiss. 60, 50-51 (1973).

- The Effekt of Dose and Time on the Induction of Genetic Alterations in Saccharomyces cerevisiae by Aminoacridines in the Presence and Absence of Visible Light Irradiation in Comparisation with the Dose-Effekt - Curves of Mutagens with Other Type of Action. Molec. gen. Genet. 144, 131-140 (1976).

Freese, E.: J. Mol. Biol. 1, 87 (1959a).

- The difference between spontaneous and baseanalogue induced mutations of phage T4. Proc. Nat. Acad. Sci USA 45, 622-633 (1959b).

- Molecular mechanisms of mutations. In: Hollaender, A., (Ed.), Chemical Mutagens. Plenum Press, New York-London 1971.

Fresco, J.R. und Alberts, B.M.: The accomodation of non complementary bases in helical polyribonucleotides and deoxiribonucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci. 46, 311-321 (1960).

Gräslund, A., Rigler, R., und Ehrenberg, A.: Light- induced free radicals in DNA-acridine complexes studied by ESP. FEBS Letters 4, 227-230 (1969).

Hauschild, Fr.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. Leipzig, Georg-Thieme Verlag 1973.

Herbold, B.: Untersuchungen zur Sensitivität des Lebermikrosomentestes unter Berücksichtigung der Aktivierungsfähigkeit der Lebermikrosomen verschiedener Säugerspecies und der Verwendung unterschiedlicher Indikatororganismen. Inaug.-Diss. Universität Düsseldorf 1976.

Kaudewitz, Fr.: Molekular- und Mikrobengenetik, Berlin Springer 1973.

Kellenberger, E., Sechaud, J., und Ryter, A.: Elektron mikroskopal studies of phage multiplikation. IV. The establishment of the DNA pool of vegetativ phage and the maturation of phage particles. Virology 8, 478-498 (1959).

Kihlman, B.A.: Induction of structural chromosome changes by visible light. Nature 183, 976-978 (1959). Cytological effects of phenylnitroamines.I. The production of structural chromosome changes in the presence of light and acridine orange. Radiat. Bot. 1, 35-42 (1961).

- Action of chemicals on dividing cells. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey 1966.

Knörr, K. und Knörr-Gärtner, H.: Das Abortgeschehen unter genetischen Aspekten. Gynäkologe 10, 3-8 (1977).

Kuhlmann, W.: Cytology and Timing of Meiotic Stages in Femal Germ Cells in Mammals and Man. In: Vogel, F. und Röhrborn, G. : Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 460-502, Berlin- Heidelberg- New York, Springer 1970.

Langridge, R.: The molecular configeration of deoxyribonucleic acid.II. Molecular models and their Fourier transformation. J. Mol. Biol. 2, 19-37 (1960).

Larson, S.L. und Titus, L.J.: Chromosomes and abortions. Mayo Cli. Proc. 45, 60-72 (1970).

Lerman, L.S.: Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. J. Mol. Biol. 3, 18-30 (1961).

- The structure of the DNA- acridine- complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49, 94-102 (1963).

- Amino group reactivity in DNA- aminoacridine- complexes. J. Mol. Biol. 10, 367-380 (1964).

- Acridine mutagens and DNA- structure. J.Cell. and Comp. Physiol. 64, Suppl. 1, 1-18 (1964).

Loveless, A.: Nature 167, 338 (1951).

Luzzati, V., Masson, F., Lerman, L.S.: Interaction of DNA and proflavin: a small angle X-ray scattering study . J. Mol. Biol. 3, 634-639 (1961).

Michaelis, A. und Rieger, R.: Über den Einfluß von Acridinfarbstoffen auf die Induktion von Chromatidenaber-

rationen durch Radiomimetika. Kulturpflanze 11, 403-415 (1963).

Michenkowa, L.Y. und Tumermann, L.A.: Biophysics 10, 696 (1965).

Mintz, B.: Embryological Phases of mammalian gametogenesis. J. Cell. Comp. Physiol. 56, Suppl.1, 31 (1960).

Nuti-Ronchi, V., und D'Amato, F.: New data on chromosome breakage by Acridine orange in the Alliumtest. Caryologia 14, 163-165 (1961).

Oakberg, E.F.: Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated at various stages of maturation in the mouse. Rad. Res. 2, 369-391 (1955).

- A description of spermiogenesis in the mouse and its use in the analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewall. Am. J. Anat. 99, 391-414 (1956a).
- Duration of spermiogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. Am. J. Anat. 99, 507-516 (1956b).
- Duration of spermiogenesis in the mouse. Nature 180, 1137-1139 (1957).

Ostertag, W. und Kersten, W.: The action of proflavine and actinomycin D in chausing chromatid breakage in human cells. Exp. Cell. Res. 39, 296-301 (1965).

Peacocke, A.R. und Skerrett, J.N.H.: The interaction of aminoacridines with nucleic acids. Trans Faraday Soc. 52, 261-279 (1956).

Peters, H., Levey, E., Crone, M.: Desoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos. Nature (London) 159, 915 (1962).

Pfanzagel, J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik II. Berlin, Walter De Gruyter- Verl. 1974.

Rieger, R. und Michaelis, A.: Die Chromosomenmutationen. Jena, VEB, G. Fischer Verlag (1967).

- Michaelis, A., Green, M.M.: Glossary of Genetics and Cytogenetics. Jena, VEB, G. Fischer Verlag (1976).

Riva, S.: Interactions of methylated acridines with DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23,606-611 (1966).

Röhrborn, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. I. Klassifizierungsversuche chemischer Mutagene. Experientia (Basel) 16, 523-529 (1960).

- Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. II. Triazinderivate. Zeit. Vererbungslehre 93, 1-6 (1962).
- Die mutagene Wirkung von Trenimon bei der männlichen Maus. Humangenetik 1, 576-578 (1965).
- Über mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen. Humangenetik 1, 205-231 (1965).
- und Vogel, F. Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch. Genetische Untersuchungen an der Maus. Dtsch. Med. Wschr. 92, 2315-2321 (1967).
- Mutagenicity Tests in Mice. I. The Dominant Lethal Method and the Control Problem. Humangenetik 6, 345-361 (1968).
- The Dominant Lethals: Method and Cytogenetic Examination of Early Cleavage Stages. In: Vogel, F. und Röhr-

born, G. (Eds.), Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 148-155, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970.

- The Activity of Alkylating Agents. I. Sensitive Mutable Stages in Spermatogenesis and Oogenesis. In: Vogel, F. und Röhrborn, G. (Eds), Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 294-316, Berlin- Heidelberg-New York, Springer 1970.
- Biochemical Mechanism of Mutation. In: Vogel, F. und Röhrborn, G. (Eds.), Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 1-15, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970.
- Chromosome Aberrations in Oogenesis and Embryogenesis of Mammals and Man. Arch. Toxikol. 28,115-119 (1971).
- und Hansmann, I.: Induced Chromosome Aberrations in Unfertilized Oocytes of Mice. Humangenetik 13, 184- 198 (1971).
- und Hansmann, I.: Oral Contraceptives and Chromosome Segregation in Oocytes of Mice. Mut. Res. 26, 535-544 (1974).
- Spontane und induzierte Mutationen beim Menschen. In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Band 9, 495-522, Berlin- Heidelberg- New York, Springer 1974.

Russel, L.B.: Chromosome aberrations in experimental mammals. Progr. med. Genet. 2, 230-249 (1962).

Ruzicska, P. und Czeizel, A.: Cytogenetic studies on mid-trimester abortuses. Humangenetik 10, 273-297 (1970).

Sax, K.: Chromosome aberrations induced by X-rays. Genetics 23, 494-516 (1938).

- The time faktor in X-ray production on chromosome aberrations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 25, 225-233 (1939).
- An analysis of X-ray induced chromosome aberrations in Tradescatia. Genetics 25, 41-68 (1940).
- Types and frequences of chromosomal aberrations induced by X-rays. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 3, 93-101 (1941).

Scheid, W. und Traut, H.: Ultraviolet- microscopical studies on achromatic lesions (gaps) induced in the chromosomes in Vicia faba. Mutation Res. 10, 159-162 (1971a).

- Visualisation by scanning electron microscopy of achromatic lesions (gaps) induced by X-rays in chromosomes in Vicia faba. Mutation Res. 11, 253-255 (1971b).

Schleiermacher,E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. I. Methodik der Präparation und Analyse meiotischer Teilungen. Humangenetik 3, 127-133 (1966).

- Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. II. Cytogenetische Befunde nach der Behandlung mit Trenimon und Endoxan. Humangenetik 3, 134-155 (1966).
- Cytology and Timing of Meiotic Stages in Femal Germ Cells of Mammals and Man. In: Vogel, F. und Röhrborn, G. (Eds.), Chemical mutagenesis in mammals and man., p. 167-180, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970.

Shedlovsky, A. und Brenner, S.: A chemical basis for the host induced modifikation of T-even bacteriophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50, 300-305 (1963).

Sirlin, H.J. und Edwards, R.G.: Sensitivity of immature mouse sperm to the mutagenic effects of X-rays. Nature 179, 725-727 (1957).

Stadler, L.J.: The experimental modofikation of heredity in crop plants. I. Induced chromosomal irregularities. Sci. Agr. 11, 557-572 (1931).

Stent, G.S. und Maaløe, O.: Radioactive phosphorous tracer studies on the reproduction of T4 bakteriophage. II. Kinetics of phosphorous assimilation. Biochem. Biophys. Acta 10, 55-69 (1953).

Stich, H.: Trypaflavin und Ribonukleinsäure, untersucht an Mäusegeweben, Condylostoma spec. und Acetabularia mediterranea. Naturwiss. 38, 435-436 (1951).

Terplitz, R. Ohno, S.: Postnatal induction of ovogenesis in the rabbit (Oryctolagus cuniculus). Exp. Cell. Res. 31, 183 (1963).

Terzaghi, E., Okada, Y., Streisinger, G., Emrich, J., Inovye, M., und Tsugita, A.: Change of a sequenz of amino acids in phage T4 lysozyme by acridine induced mutations. Proc. Nat. Acad. Sci. 56,500-507 (1966).

Vogel, F., Röhrborn, G., Schleiermacher, E. und Schröder, T.M.: Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch. Dtsch. Med. Wschr. 92,2249-2254 (1967).

- Spontaneous mutations in man. In: Vogel, F. und Röhr-

born, G. (Eds.), Chemical mutagenesis in mammals and man, p. 16-68, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1970.

- Röhrborn, G. und Hansmann, I.: Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24, Nr. 10, 1665-1677 (1974).

Witkin, E.M.: Mutations in E. coli induced by chemical agents. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 12, 256-269 (1947).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Röhrborn gilt meine Dankbarkeit für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der wissenschaftlichen Betreuung dieser Arbeit, für seine Hinweise und Ratschläge, die zum Gelingen dieser Untersuchungen entscheidend beitrugen.

In Dank verbunden bin ich ebenso Herrn Dr. A. Basler für seine stete Ansprechbarkeit für sich auftuende Probleme und seine Bereitschaft, mir jede mögliche theoretische und praktische Hilfestellung bei der Durchführung dieser Dissertation zuteil werden zu lassen.

Lebenslauf

Am 25. Oktober 1950 wurde ich als erstes von drei Kindern des Ehepaares Franz und Annemarie Nobis, geborene Sustersic in Gindorf bei Grevenbroich geboren.
Nach vierjährigem Besuch der dortigen Volksschule wechselte ich zum Kreisgymnasium in Grevenbroich, an dem ich den humanistischen Zweig einschlug. Am 29. Mai 1969 bestand ich die Abiturprüfungen.
Meinen Wehrdienst leistete ich beim Panzerbataillon 14 in Hildesheim ab.
1972 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Frankfurt. Nach dem zweiten Semester wechselte ich zur Universität Düsseldorf.
Am hiesigen Institut für Humangenetik und Anthropologie erhielt ich von Prof. Dr. G. Röhrborn das Thema für die vorliegende Arbeit.